

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios
de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* (tabaco
cimarrón), extraídos de las Lomas de Lachay**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Recursos Vegetales y
Terapéuticas

AUTOR

Joyce Dione del Pino Robles

ASESOR

Pablo Enrique Bonilla Rivera

Lima – Perú

2008



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Con todo mi amor:

**Para mi esposo que me impulsa, me da fuerzas y me
comprende siempre.**

Para mis hijos a los cuales quiero dejar un mensaje:

“nunca es tarde para aprender”

Deseo mostrar mi más profundo agradecimiento y reconocimiento:

Al Dr. Pablo Bonilla quien además de asesor es siempre un excelente maestro.

Al Dr. Alejandro Fukusaki quien me apoyó en la etapa de extracción.

Al Dr. Agustín Iza quien apoyó y dio autorización para el uso de materiales y

Laboratorios de la UCSUR.

A Elfer Valdivia quien revisó y dio sugerencias en la parte de microbiología.

Al Mg. Asunción Cano quién me apoyó en la parte de identificación y descripción

histológica.

Al Jurado revisor de Tesis presidido por la Dra. Eleucy Pérez que con sus

acertadas sugerencias pulieron este trabajo.

Muchas gracias a todos por su confianza y por todo lo que aprendí con ustedes.

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
2.1. Marco Geográfico	3
2.2. Plantas Medicinales	4
2.3. El género Nicotiana	6
III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	9
3.1. Materiales y Métodos	9
3.1.1. Recolección y preparación de la muestra problema	9
3.1.2. Identificación taxonómica del material biológico de estudio	9
3.1.3. Descripción morfológica externa	13
3.1.4. Descripción histológica	16
3.1.5. Determinación de la humedad	16
3.1.6. Obtención de extractos e identificación de metabolitos secundarios	17
3.1.6.1. Obtención de extracto en éter de petróleo	17
3.1.6.2. Obtención de extracto en acetato de etilo	17
3.1.6.3. Obtención de extracto en alcohol de 60%	17
3.1.6.4. Identificación de metabolitos secundarios	17
3.1.7. Determinación de CL ⁵⁰	18
3.1.8. Ensayo de toxicidad aguda	18
3.1.9. Determinación de la actividad antimicrobiana	20
3.1.9.1. Método de difusión por discos o Kirby Bauer	21
3.1.9.2. Método modificado de los pozos de agar	22
3.1.10. Procesamiento de los datos	22

	24
le <i>Nicotiana paniculata</i>	24
4.2. Determinación de la humedad	29
4.3. Screening fitoquímico	29
4.4. Determinación de DL50	31
4.5. Ensayos de citotoxicidad	31
4.5.1. Estudio de citotoxicidad	31
4.5.2. Genotoxicidad <i>in vivo</i>	33
4.6. Determinación de actividad antimicrobiana	34
4.6.1. Método Kirby Bauer	34
4.6.2. Método de los pocillos	41
V. DISCUSIÓN	49
VI. CONCLUSIONES	58
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
VIII. ANEXOS	73

RESUMEN

El presente trabajo reporta la actividad antimicrobiana y antifúngica de extractos obtenidos de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* L, especie endémica del Perú cuyas muestras fueron colectadas en las Lomas de Lachay, en el Departamento de Lima. Se estudió la actividad antimicrobiana comparando los métodos de Kirby Bauer o disco difusión y el método de excavación placa cultivo encontrando que el método de excavación es más sensible para evaluar actividad antimicrobiana. Las cepas utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P *Candida albicans* ATCC 10231 y una muestra hospitalaria de *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando actividad antimicrobiana frente a cepas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (16 a 30mm) y ligera inhibición del crecimiento para *Escherichia coli* y *Candida albicans* (11 a 15mm).

Se estudió también la actividad citotóxica y genotóxica *in vivo* de los extractos hidroalcohólicos de hojas y flores a través de la prueba de micronúcleos, encontrando que son capaces de producir daños a nivel citogenético y al ADN, con relación dosis-dependiente tanto para la frecuencia de micronúcleos como para el índice de células dañadas. Se realizaron extracciones de metabolitos secundarios de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* usando como solventes éter de petróleo, acetato de etilo y alcohol etílico y se identificó la presencia de alcaloides (nicotina y nornicotina), compuestos fenólicos y glicósidos como principales constituyentes. Se determinó la CL⁵⁰ para el extracto hidroalcohólico que nos indicó que las flores presentan mayor potencial citotóxica que las hojas con un CL⁵⁰ de 980µm/mL.

PALABRAS CLAVE: *Nicotiana paniculata*, antimicrobiano, antifúngica, citotóxico, genotóxico.

ABSTRACT

This study report the bacterial and mycotic activity of the extracts from leaves, and flowers from the *Nicotiana paniculata* L (NPL) samples collected at Lomas de Lachay, Lima region, Perú. The antibacterial activity of the standard strains *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Candida albicans* ATCC 10231, and a wild *Pseudomona aeruginosa* strain was determined by comparison of sensitivity tests using a plate dilution method in which the drugs were provided by impregnated filter papers, and the culture plate hole method recommended by Standard Microbiological Methods (2001). The standard strains *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P showed to be susceptibility to the NPL extracts with inhibitory zone from 16 mm to 30 mm; while the *Escherichia coli* ATCC 10536, and *Candida albicans* ATCC 10231 displayed intermediate sensitivity (from 11 to 15 mm) to the testing extracts.

In addition, the cytotoxic and genotoxic activity of the hydro alcoholic leaves, and flowers of the NPL were carried out by micronucleus test; the cytogenetic and the DNA damaged were observed to be dose-dependent. The secondary metabolites of the leaves and flowers of the NPL obtained by petroleum ether, ethyl acetate, and ethyl alcohol treatments allowed identifying the alkaloids nicotine, and nornicotine as well as phenolic and glycosilic products as main components. The CL₅₀ of the NPL flower extract showed higher cytotoxic effect (980 $\mu\text{m/mL}$) than the NPL leaves extract.

Key words: *Nicotiana paniculata*, antimicrobials, cytotoxicity, genotoxicity, antifungal

INTRODUCCIÓN

El primer texto escrito sobre plantas medicinales data del año 3000 antes de Cristo. Sus autores, los sumerios (Mesopotania), grabaron en tablillas de arcilla todos los conocimientos recopilados hasta aquella época sobre las propiedades curativas de las plantas. Así es como comienza la historia oficial de la fitoterapia (Alarco, 2000). Aunque en realidad, las plantas han venido siendo utilizadas por el hombre desde los tiempos más remotos, tanto para alimentarse como para curarse (Carballo, 2005).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente, el 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de asistencia médica. La terapéutica tradicional se basa sobre todo en el empleo de extractos o principios activos de las plantas (OMS, 2002; Fuertes, 2001; Angulo, 1997; Angulo, 1988).

Los resultados preliminares de un estudio realizado por la OMS en el año 2002, muestran que son muchas las personas que utilizan plantas medicinales y que su número tiende a aumentar incluso entre los jóvenes. Ahora bien, la importancia de las plantas medicinales no se limita a los países en desarrollo. En los Estados Unidos de América, por ejemplo, en el 25% de todas las recetas despachadas por las farmacias públicas entre 1959 y 2002, figuraban sustancias procedentes de plantas superiores. Durante el último decenio, la Asamblea Mundial de la Salud ha adoptado cierto número de resoluciones en respuesta al interés que vuelve a manifestarse por el estudio y el empleo de la medicina tradicional en la asistencia médica, y en reconocimiento de la importancia que tienen las plantas medicinales para los sistemas sanitarios de muchos países en desarrollo (OMS, 2002).

En el Perú, por sus condiciones climáticas y por la diversidad de biorregiones existe una abundante flora silvestre cuyas aplicaciones medicinales, aún no están muy difundidas. Las comunidades rurales del interior del país utilizan tradicionalmente las plantas como medio de curar sus enfermedades. Ellos han recibido de generación en generación un bagaje de conocimientos que se ha acumulado desde tiempos inmemoriales sobre selección, manejo, conservación y usos de las diferentes especies de plantas que crecen en nuestra patria, y en los últimos años los habitantes de las ciudades están utilizando

auge de la medicina tradicional, la que se ha visto
vés de los medios de comunicación (Frisancho, 2002;
Gonzáles, 2000; Monge, 1998; Salas, 1996; MacBride, 1962; Weberbauer, 1945).

Entre estas especies se tiene a *Nicotiana paniculata* L ñtabaco cimarrónö, una solanácea endémica del Perú. Es una planta anual conocida de varias localidades, principalmente en la costa central y partes bajas de la vertiente occidental de los Andes. Por la amplitud de su distribución y la buena representación en los herbarios se la conoce como de preocupación menor en cuanto a su estado de amenaza (León, 2006).

Esta planta es utilizada por los residentes de las zonas rurales. Así tenemos que los campesinos usan cataplasmas de hojas de *Nicotiana paniculata* para eliminar las larvas de insectos lepidópteros cuando contaminan las heridas. También sumergida en alcohol, se usa como frotación para dolores articulares y reumáticos. Además se ha identificado que la aplicación externa de la esencia de tabaco con jugo de limón se usa para curar mordeduras de arañas y picaduras de alacrán.

La presente investigación tiene como objetivos determinar el efecto antimicrobiano y citotóxico de los metabolitos bioactivos que se encuentran en las hojas y flores de la especie encontrada en las Lomas de Lachay, además de validar la determinación taxonómica de la especie, realizando un protocolo botánico (sistemático, descripción morfológica externa, y descripción histológica).

2.1. Marco Geográfico.

El desierto costero del Perú constituye una unidad geomorfológica característica, formada por el conjunto de cerros, colinas y lomas bajas así como ramales de la porción inferior del flanco occidental andino que irrumpe al mar.

Las òlomasö costeras constituyen biocenosis particulares, con características peculiares que se presentan entre los 6° a los 18° de latitud sur del desierto costero. Es una zona ecológica típica para el Perú y está definida por la presencia de estribaciones andinas cercanas al mar que no pasan de los 1200 m de altura, con especiales condiciones ecológicas que determinan una vida vegetacional periódica (reverdecen de mayo a octubre) y que desde el punto de vista ecológico constituyen una òbiocenosis terrestre cercana al marö o llamada también òbiocenosis de vegetación de neblinaö (Dillon, 1997; Brack, 1986; Pefaur *et al*, 1981).

Las lomas están caracterizadas por una marcada estacionalidad como consecuencia de la variación de factores climáticos, que determinan las épocas, una seca y una húmeda. Esta estacionalidad se ve alterada por fenómenos climatológicos como el evento òEl Niñoö, cuya ocurrencia ocasiona cambios en las condiciones climáticas que influyen sobre las comunidades vegetales. (Cano, 1999; Arana, 1998; Dillón, 1989). El concepto de lomas queda así definido, como el conjunto de vegetales y animales que se desarrollan y tienen hábitat favorable en las formaciones orográficas vueltas hacia el mar (Pefaur, 1981).

Las Lomas de Lachay se encuentran ubicadas a 105 Km. al norte de Lima (11°20' 48" ó 11° 24' 30" L.S. y 77° 19' 45" ó 77° 28' 55" L.O.), en la Provincia de Chancay, Departamento de Lima (Fig. 1). Es la única loma con representatividad en el Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado (SINANPE), siendo establecida como Reserva Nacional el 21 de Junio de 1977 por D.S. N° 310-77-AG (INRENA, 2002; Guabloche, 2000; Chang, 1979). Esta loma alberga una variada fauna y flora silvestre. Entre las plantas se encuentra la especie *Nicotiana paniculata*, considerada endémica cuya abundancia en este ecosistema es reconocido por algunos autores

Las investigaciones acerca de las lomas del Perú son abundantes, pero muy generales y la mayoría presenta una descripción de las variedades florística y faunística de la zona. Sin embargo, en muy pocos casos se han efectuado estudios específicos en relación a determinación bioquímica de las plantas que habitan en lomas, como es el caso de *Nicotiana paniculata*, una planta endémica de las Lomas de Lachay (Kunimoto, 2002).

2.2. Plantas Medicinales

Las plantas producen compuestos primarios importantes para su metabolismo; también sintetizan compuestos secundarios que le sirven para atraer polinizadores, ahuyentar o matar parásitos y prevenir enfermedades infecciosas (Bonilla, 2002; Bruneton, 1991). Estas características especiales han sido descubiertas por nuestros antepasados los cuales utilizaron estas propiedades para combatir enfermedades y trastornos que los atacaban. La tradición oral y el carácter ágrafo prehispánico, y por ende la ausencia de documentos ó con excepción de algunos códigos jeroglíficos mesoamericanos - impiden hacer una apreciación objetiva. Se calcula que la mnemotecnia de la tradición oral no pasa de 600 años, lo cual está sustentado con las investigaciones de Pedro Cieza de León, Bernardino de Sahagüm, Guaman Poma de Ayala, Fernando Cabieses y Federico Kauffman, entre otros; sin embargo, más allá la historia se deforma por la neblina del pasado no documentado (Frisancho, 2002).

El uso de las plantas en medicina tiene una historia extraordinaria, ya que en determinados momentos todos los medicamentos se obtenían de fuentes naturales. Este evento dio lugar al establecimiento de una relación muy cercana y productiva entre el hombre y la flora silvestre residente (Alarco, 2000; Palacios, 1997).

Los primeros herbolarios datan de la época de los asirios, los babilonios y los fenicios y constituyen una recopilación de los conocimientos de la época sobre las propiedades curativas de las plantas, comenzando la historia de la fitoterapia (Pahlov, 1979). Entre datos curiosos se sabe que Cleopatra utilizaba aloe barbado para potenciar su belleza, y

mo el tratamiento adecuado para las quemaduras por

La mayoría de las medicinas provenientes de las plantas que ahora usamos no fueron descubiertas por las ciencias de las sociedades modernas, sino por pruebas de ensayo y error practicadas durante milenios, por diferentes culturas. Teniendo en cuenta el uso de las plantas medicinales, podemos decir que existen cuatro tipos generales de medicina. Ellas son: asiática, europea, indígena y neo-occidental. Tanto la asiática como la europea que datan de miles de años, se encuentran en la farmacopea y son por lo tanto más conocidas; en el caso de la indígena es distinto ya que ha sido transmitida oralmente. (Cabieses, 1996; Brack, 1999; Angulo, 1997; Cerrate, 1990).

La herboristería indígena es muy diversa y se practica aún en sitios donde dichas culturas se encuentran intactas, sin embargo se halla en continua evolución debido al contacto con otras culturas aledañas (Alarco, 2000; Brack, 1999; Cano 1999; Cabieses, 1996; Caycho, 1980). En cuanto a la herboristería neo-occidental, utiliza preparaciones de plantas únicas o mezclas, en variadas combinaciones, que han sido seleccionadas de formulaciones que se encuentran en las antiguas farmacopeas o plantas medicinales de otras culturas, como por ejemplo la indígena. Pueden obtenerse también formulaciones novedosas que no presentan fundamento en datos provenientes de herboristerías tradicionales, o representan una mezcla de plantas utilizadas en distintas medicinas alternativas (Carballo, 2005; Chifa, 2002)

El incremento en el uso de productos farmacéuticos ha dado por resultado la disminución del consumo de preparados tradicionales de la medicina popular. Sin embargo, en algunas áreas rurales la medicina tradicional es aún utilizada en igual o mayor medida que las formulaciones farmacéuticas, y en algunos casos, como en las enfermedades menores sustituyen a la medicina académica (Goodman, 1996; Monge, 1996; Castillo, 1990; Herrera, 1940).

A pesar de los siglos de tradición, la fitoterapia ó del griego *phyton* (planta), que es el tratamiento de las enfermedades por plantas frescas, secas o sus extractos ó ha evolucionado y ha ganado prestigio y eficacia, sobretodo en los últimos tiempos, acercándose cada vez más a las normas y usos que exige la medicina moderna. Como

... tiene un mejor conocimiento de las propiedades de su número, se han desentrañado científicamente secretos de sus principios activos y se han descrito con más precisión sus propiedades, contraindicaciones y efectos secundarios, lo que ha redundado en una más correcta sistematización de su uso y posología (Lewis, 2003; Frisancho 2002; Bonati, 1989).

Debido a la mayor información sobre el potencial terapéutico del mundo vegetal, se ha desarrollado la investigación de nuevos preparados obtenidos a partir de plantas en los que la selección de ingredientes se realiza en los laboratorios. Esto ha devenido en el nacimiento de la nueva fitoterapia, en que la preparación y validación de las formulaciones a base de diversas especies vegetales las realizan profesionales especializados, capaces de satisfacer las necesidades que el usuario de la fitoterapia reclama en aspectos importantes como la prevención y salud (Monge, 1996; Palacios, 1997; Rodríguez, 2002).

Un dato relevante sobre el uso de las medicinas alternativas realizado en Estados Unidos entre 1990 y 1997, mostró que al menos un tercio de los pacientes usaban terapias no convencionales, y la mayoría las utilizaba en el tratamiento de patologías crónicas (Eisenberg *et al*, 1997). A su vez, muchas hierbas medicinales son utilizadas con fines profilácticos para mantener o favorecer un estado de buena salud, o prevenir la ocurrencia de ciertas patologías (Goodman, 1991).

El apoyo de la etnomedicina para el análisis y conocimiento de este tipo de medicina popular como fuente de investigación de la medicina prehispánica es importante para su aplicación en la actualidad (Monge, 1996).

2.3. El género *Nicotiana*

El género *Nicotiana* de la familia Solanaceae (Chifa, 2002; Atanassova, 2001; Barendse, 2001; Nee, 2001; Cano *et al*, 1999; Brako, 1991; Cerrate, 1990; Hawkes, 1979; Goodspeed, 1961 y 1954), comprende unas 50 especies para el continente americano de las que 15 han sido identificadas en el Perú (Soukup, 1978; Herrera, 1940). Sus caracteres morfológicos son variados; hay matas, arbustos y árboles. El aspecto y estructura depende de los factores climáticos, edáficos y bióticos (Ferreya,

a la distribución geográfica de las especies; unas son
asociaciones boscosas (Sanz-Elorza, 2005, Mace, 2001).

El tabaco es nitrófilo por eso se le encuentra cerca de las viviendas o donde existen
restos de animales aprovechando el nitrógeno de los desechos (Ulacio, 1997).

Expertos en genética vegetal han determinado que el centro de origen del tabaco, el
lugar donde se cultivó por primera vez, se sitúa en la zona andina entre Perú y Ecuador.
Los primeros cultivos debieron tener lugar entre cinco mil y tres mil años a.C.
Posteriormente el consumo se extendió hacia el norte. Cuando se descubre América, el
consumo estaba extendido por todo el continente. El tabaco se aspiraba por la nariz, se
masticaba, se comía, se bebía, se untaba sobre el cuerpo, se usaba en gotas en los ojos y
se usaba en enemas. Se usaba en ritos como soplarlo sobre el rostro de guerreros antes
de la lucha, se esparcía en campos antes de sembrar, se ofrecía a los dioses, se
derramaba sobre las mujeres antes de una relación sexual, y tanto hombres como
mujeres lo utilizaban como narcótico. Los Mayas la usaban en sus celebraciones rituales
y religiosas y fue descubierta por los occidentales en 1492 (Caycho, 1980).

El género *Nicotiana* ha sido muy utilizado en la industria tabacalera que genera y
ordena grados fitoculturales de técnica y economía. Todos los tabacos cultivados
pertenecen al género *Nicotiana*, nombre que le fue dado en 1565 por Jean Nicot de
Villemain, considerado uno de los padres de esta planta. La tecnología agrícola e
industrial del tabaco moviliza grandes inversiones para el cultivo y comercialización de
este producto (Pascual, 2004).

En la farmacopea vernacular algunas especies del género *Nicotiana* son usadas para
aliviar numerosas dolencias e intereses particulares, lo que los ubica dentro del grupo
de plantas con importancia, posibilidades y perspectivas del aprovechamiento de sus
principios activos a nivel mundial. Por ejemplo: *Nicotiana glauca* es muy venenosa y a
veces es utilizada para eliminar animales; las hojas molidas y aplicadas en cataplasmas
de *Nicotiana undulata* es usada para curar edemas (Carballo, 2005; Zelada, 2000; Glass,
1999, Roddick, 1991; Cerrate, 1990; Smith, 1948).

En el estudio de Plantas Medicinales y otras especies útiles. Diagnóstico situacional sobre
la producción, industrialización y comercialización, preparado por el Instituto

ra la Agricultura (IIAC) y el Centro de Desarrollo de (TRA) de Nicaragua en el 2005, se indica que la especie *Nicotiana tabacum* es usada por los nativos para combatir las garrapatas.

En nuestro país existían desde la antigüedad especies cimarronas (no cultivadas) de tabaco como es el caso de *Nicotiana paniculata*. Los antiguos peruanos no le dieron el uso de fumado, sino que la utilizaban como especie medicinal aplicando el zumo, polvo, cocimiento y humo de sus hojas contra diferentes enfermedades como por ejemplo para calmar dolores de luxaciones, reumatismo (hojas como cataplasma), como insecticida en fumigaciones para ahuyentar zancudos (Brack, 1999; Palacios, 1997). También lo usaban para eliminar cataratas y carnosidades de la piel y contra la picadura de insectos (Palacios, 1997) y en la etnoveterinaria como insecticida (contra la falsa garrapata de los ovinos, piojera) para uso exterior en animales domésticos (Bazalar, 1989; Sumar, 1979) y se encuentra reportada como planta psicoactiva (Kvist, 2006).

Actualmente los pobladores de las zonas rurales, como por ejemplo en las Lomas de Lachay, prepararan cataplasmas en bases a hojas de *Nicotiana paniculata* para eliminar las larvas de insectos lepidópteros cuando contaminan las heridas, y también es usado como frotación cuando se le sumerge en alcohol para dolores articulares y reumáticos. Entre otros usos se menciona también que la esencia de tabaco con jugo de limón es utilizado para mordeduras de arañas y picaduras de alacrán; siendo de aplicación externa este preparado. En la actualidad esta especie está siendo utilizada en algunos centros de producción para evitar la invasión de zancudos e insectos como forma de proteger los cultivos de uvas (Pulido, com.per).

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1. Recolección y preparación de la muestra problema

La muestra biológica utilizada en la presente investigación *Nicotiana paniculata* òtabaco cimarrónö, fue colectada en la Reserva Nacional òLomas de Lachayö, ubicada a 105 Km, al norte de la ciudad de Lima, en la provincia de Chancay, departamento de Lima (Fig.1).

Se colectaron las muestras teniendo el cuidado de escoger ejemplares que tengan todas las partes de la planta, es decir raíz, tallo, hojas, flores y frutos. Terminada la recolección se ha verificado que las muestras obtenidas estén limpias y pertenezcan a la misma especie.

3.1.2. Identificación taxonómica del material biológico de estudio

La identificación taxonómica y la descripción externa de la planta se realizó con la supervisión del Mg. Asunción Alipio Cano Echevarría, Jefe del Departamento de Dicotiledóneas del Museo de Historia Natural òJavier Pradoö de la UNMSM. Para esta determinación se usaron muestras frescas y muestras preparadas para herbario.

Para la identificación se usaron como ayuda las listas de plantas de la zona estudiadas por Galán de Mera, 2004; Cano, 1999; Mostacero, 1996; Vilcapoma, 1989; Weberbauer, 1945 y principalmente el Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Perú (León, 2006). Las claves utilizadas fueron de Judd, 1999; Takhtajan, 1997; Brako, 1991; Cronquist 1988 y 1981; Soukup, 1978 y Macbride, 1962.

La familia de las Solanáceas comprende 2500 especies que se distribuyen por todo el mundo especialmente en América Tropical y son fundamentalmente

Muchas de sus especies tienen una valor importante por sus propiedades alimentarias (papa, tomate, pimiento, etc.), por sus propiedades alcaloides (tabaco, belladona, mandrágora, etc.) y como plantas de jardín (petunia, floripondio, azahar de novia) (Alarco, 2000; Arana, 1988).

Dentro de esta familia se encuentra la tribu Nicotianeae que presenta tres subtribus y seis géneros. La Subtribu Nicotianinae tiene tres géneros dentro de los cuales se encuentra el género *Nicotiana* (DøArcy, 1973, López Guillén, 1952)

El género *Nicotiana* presenta aproximadamente 284 especies reportadas según la Base de datos TROPICOS del Missouri Botanical Garden (hasta el 7 de febrero del 2008), siendo tres especies las más importantes por su interés para el cultivo: *Nicotiana rústica*, *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana petunoide*. Sin embargo, el 90% del tabaco cultivado industrialmente en el mundo pertenece a la especie *Nicotiana tabacum*.

En el Perú tenemos reportada, según el catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú de Brako (1991), 23 especies de las cuales, solo seis son consideradas endémicas de nuestro país; *Nicotiana benavidessi*, *N. knightiana*, *N. raimondii*, *N. setchelli*, *N. thyrsoflora* y *N. paniculata* (León, 2006; Rodríguez, 1998, Palacios 1997; Sagátegui, 1973; Harper, 19..)

La especie *Nicotiana paniculata* que fue identificada por primera vez en 1753, ha sido reportada en el Perú en zonas de lomas de la costa peruana, aunque también se ha registrado en la sierra. Existen registros en los departamentos de Ancash, Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Ica, Junín, La Libertad, Lambayeque, Lima, y Moquegua (Takhtajan, 1997; Soukup, 1978; DøArcy, 1973).

Una de las lomas de la costa peruana en la cual ha sido reportada esta especie es Lomas de Lachay (Fig. 1).



Fig. N°1. Ubicación Geográfica de la Reserva Nacional de Lomas de Lachay

El tabaco cimarrón tiene la siguiente ubicación taxonómica: (de acuerdo a Cronquist, 1988)

REINO:	PLANTAE
DIVISIÓN:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE:	ASTERIDAE
ORDEN:	SOLANALES
FAMILIA:	SOLANACEAE
GÉNERO:	NICOTIANA
ESPECIE:	<i>Nicotiana paniculata</i> L.

NOMBRE COMÚN: òtabaco cimarrónö, òccamasairiö, òccama sayariö, òtabaco silvestreö, òtabaquilloö, òtabacoö, òutashayliö, òkkuruö, òpuilleö,

registrada con el código USM: 217878, llevada al
 confirma la clasificación propuesta (ver constancia N°

12 -UNMSM-2008).



Fig. N° 2. Muestra para herbario de *Nicotiana paniculata*

lógica Externa

Nicotiana paniculata es una planta anual, de desarrollo bastante rápido, que florece entre los 2 y 3 meses de brotar, puede alcanzar un gran porte y superar con facilidad los 2 metros de altura al florecer (Fig. 2, 3, 4).

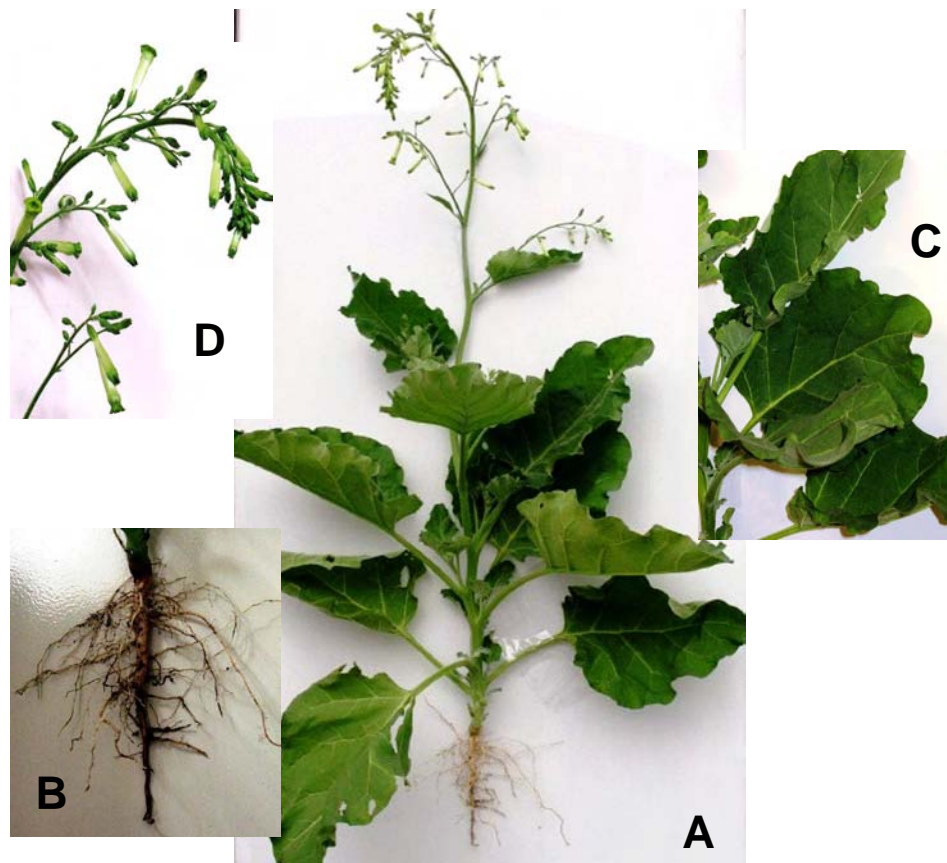


Fig. N 3. Macrofotografía de muestra fresca de *Nicotiana paniculata*.
A: Planta completa. B: Detalle de la raíz. C: Hojas. D: Inflorescencia.

La raíz es de forma cónica, de color blanco marfil, fibrosa, que se va ramificando en numerosas raíces secundarias a medida que va desarrollándose, mide aproximadamente entre los 15 a 50 centímetros de longitud. La raíz principal puede llegar a medir hasta 22 centímetros de longitud y las raíces secundarias que se van adelgazando a medida que se alejan del eje principal hasta convertirse en hilillos cilíndricos llegan a alcanzar longitudes de 30 a 35 centímetros (Fig. 3B).

El tallo es pubescente, herbáceo recto y subleñoso, de color verde, con ligeros surcos o estrías longitudinales, provista de hojas desde la base hasta el

encia que por lo general son terminales. Mide entre 50
ud y de una a dos centímetros de diámetro, el cual va
adelgazándose conforme avanza la parte terminal. Las ramas laterales se
disponen en forma alterna, siendo frecuente el desarrollo de yemas axilares
dando lugar a que el aspecto general de la planta sea compacto (Fig. 3A).

Las hojas se disponen en forma alterna, simples pecioladas, de color verde claro,
muy pubescentes tanto en haz como en el envés. La nervadura media es muy
pronunciada, presentando una típica nervación pennada, al envés se pueden
observar nervaduras secundarias que se unen entre sí formando una red muy fina
(Fig. 3C y Fig. 4).

Las flores tienen formas tubulosas cilíndrica, acampanadas y se agrupan en
inflorescencias complejas, panojas terminales. El eje principal de la
inflorescencia es bien desarrollado, siendo en un principio el eje de la misma
planta, la porción terminal del tallo, aunque no siempre es constante esta
disposición. Alcanza dimensiones de 30 a 60 cm. Presenta botones florales que
nunca llegan a madurar y que al final se caen (Fig. 3D, 3A, 4).

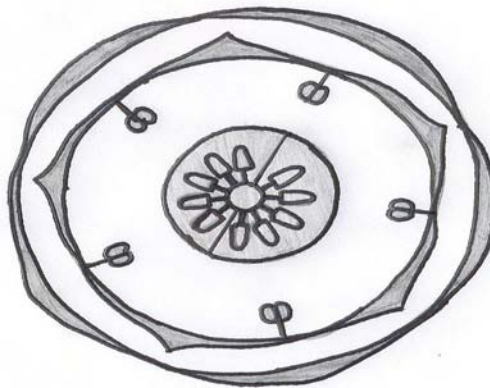


Fig. 4. Esquemas de la planta *Nicotiana paniculata*. **Detalle de las hojas y flores.**

hermafroditas, heteroclamídeas, cáliz gamosépalo, pubescente solo de la parte externa; las corolas son de color verde claro, gamopétalas, actinomorfa, pentámera, tubulosa; el androceo está representado por cinco estambres, de filamentos delgados, concrecentes a la corola en el quinto inferior; poseyendo estos un conjunto de pelos que le dan un aspecto muy particular, los filamentos son de diferente longitud. Las anteras no llegan a sobresalir del tubo corolino, siendo estas uniformes en sus dimensiones, son introrsas, ditécicas, dorsifijas y de dehiscencia longitudinal. Ovario súpero piriforme, color verde oscuro, bicarpelar, bilocular. El estilo es cilíndrico, no pubescente, de color verde claro; estigma globoso con un surco longitudinal profundo en la parte central que divide en dos partes a este órgano, muy papiloso.

Fórmula Floral: * K (5), [C (5), A 5], G 2

Diagrama Floral: ver esquema (Fig. 5)



Fórmula Floral: * K (5), [C (5), A 5], G 2

Fig. Nº 5. Diagrama floral de *Nicotiana paniculata* l tabaco cimarrónî .

Sus frutos son capsulas dehiscentes con numerosas semillas y abundante endospermo. La semilla tiene forma casi reniforme, siempre son de color marrón oscuro o "color tabaco" y son muy pequeñas; un gramo contiene entre 8 000 y 12 000 semillas.

Para la descripción histológica se realizaron cortes transversales a mano alzada de 10 a 12 μm de raíz, tallo y hojas de la muestra objeto de estudio. Los cortes fueron coloreados con safranina al 0.5% y para dar contraste con light green al 1% y observadas al microscopio óptico de campo claro Marca Micros modelo MCD300 con objetivos de 4X, 10X y 40X. Para realizar una mejor descripción de los tejidos se tomaron fotos.

Para obtener cortes más finos se fijaron las muestras en solución etanol-ácido acético-acetato de etilo (FAA), en volúmenes de 90: 5: 5 respectivamente, luego se incluyó en parafina para formar bloques, los mismos que fueron llevados al micrótopo, obteniéndose cortes de 4 a 8 μm y se colorearon con azul de toluidina al 2%. Se observaron al microscopio óptico de campo claro con objetivos de 4X, 10X y 40X. Para realizar una mejor descripción de los tejidos se tomaron fotos. Para la descripción de los tejidos se usaron como referencia a Paniagua, 1994; Krommer, 1985; Fahn, 1985 y Esau, 1972.

3.1.5. Determinación de la humedad

Para determinar el porcentaje de humedad se tomaron muestras de 100 gramos de la planta completa, 50 gramos de las hojas, 10 gramos de las flores, las cuales fueron puestas a estufa de aire circulante marca MCR a una temperatura de 40°C verificándose el peso cada 24 horas, hasta obtener el peso constante.

Se obtuvo el porcentaje de humedad siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \frac{\text{Peso final} \times 100}{\text{Peso inicial}}$$

Se realizaron 3 pruebas de cada muestra.

3.1.6.1. Obtención del extracto en éter de petróleo.

Se pesaron 150 gramos de hojas de *Nicotiana paniculata* deshidratadas a 40°C y molidas, posteriormente fueron puestos en un balón al cual se le agregó un litro de éter de petróleo. A las 24 horas se filtró usando papel filtro Watman #2; el filtrado se guardó en un frasco con tapa. Luego se agregó 500 mL de éter de petróleo a las hojas molidas y se dejó reposar por 24 horas, después de las cuales se filtró y guardó el filtrado. Este proceso fue realizado 2 veces.

Las soluciones extraídas fueron puestas en un rotavapor Marca Heidolph Laborota 4000 al vacío, para separar el éter de petróleo. A este extracto se le denominó H1. El mismo procedimiento se realizó con las flores, a este extracto se le denominó F1.

3.1.6.2. Obtención de extracto en acetato de etilo.

La muestra del experimento anterior se procedió a dejar secar, para que se evapore todo el éter de petróleo y se le agregó un litro de acetato de etilo realizándose el mismo procedimiento del experimento anterior. A este extracto se le denominó H2. Al extracto de flores se le denominó F2.

3.1.6.3. Obtención del extracto en alcohol al 60 %.

A la muestra seca del procedimiento anterior se le agregó un nuevo solvente, alcohol al 60%. A este extracto se le denominó H3. Al extracto de flores se le denominó F3. Estos extractos se utilizaron para las pruebas de citotoxicidad y actividad antimicrobiana.

3.1.6.4. Identificación de metabolitos secundarios

Se efectuó la identificación de metabolitos secundarios empleando una marcha fitoquímica y técnicas de cromatografía de capa fina, a fin de identificar los posibles grupos químicos responsables de la actividad antimicrobiana y citotóxica. (Bonilla, 2002; Chifa, 2002; Endermoglul, 2001; Córdova, 1991; Domínguez 1979; Lock 1994 y Galindo 1989).

La prueba de CL⁵⁰ con *Artemia salina*, es un bioensayo muy utilizado para determinar la CL⁵⁰ de un extracto vegetal utilizando las larvas o nauplos de *Artemia salina* como sujeto de prueba. Se pesaron 200mg de los extractos hidroalcohólicos de hojas y flores, y se diluyeron en 20ml de acetona. Se realizaron diluciones que tengan una concentración final de 10, 100, y 1000µg /mL respectivamente, preparándose 3 viales por cada concentración. Se preparó un vial control de solvente de acetona de 500 µl.

Para obtener las larvas de *Artemia salina* se depositaron los huevos de camarón salino al tanque de eclosión que contenía solución de sal de mar (3.8%) que se prepara una hora antes y se filtra. El tanque se deja en la oscuridad por 48 horas, tiempo en que las larvas eclosionan y se separan las larvas de los huevos que no eclosionaron.

En viales limpios, secos y esterilizados se adicionaron cinco mL de agua de mar filtrada, a los cuales se les adicionó 10 larvas más la concentración a evaluar. Se emplearon 10 viales por concentración, más el control por triplicado. Se dejó el cultivo por 24 horas. Transcurrido el tiempo se procedió a contar las larvas muertas con ayuda de un microscopio estereoscopio Marca Micros modelo CE. Se consideraron larvas muertas a aquellas que no presentaban movimiento. Estos datos se procesaron en un programa de Probit Finney para obtener la dosis letal media (CL⁵⁰).

3.1.8. Ensayo de toxicidad aguda

Se evaluó la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de *Nicotiana paniculata* a través de una prueba *in vivo*, el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. En esta prueba se usó el extracto alcohólico de hojas de *Nicotiana paniculata* obtenido previamente. Se usaron ratones hembras y machos de la cepa Swiss Rockefeller de 6 a 10 semanas de edad, de pesos de 25 a 35 g (Bioterio del Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo-FFCC

mantenidos con alimento balanceado y agua ad *libitum*,
10 horas luz / oscuridad.

El tratamiento utilizado fue el siguiente: los ratones se dividieron en cinco grupos; cada grupo contó con cinco individuos, el primer grupo se consideró el grupo control negativo (CN) al cual se le suministró intraperitonealmente (i.p.) agua destilada; a los otros grupos (TI, TII, TIII) se les inyectó vía i.p. el extracto acuoso de la hoja de tabaco; TI= 25 mg/kg, TII= 50 mg/kg y TIII= 75 mg/kg de peso corporal (pc) respectivamente y al control positivo (CP), se le administró Ciclofosfamida vía i.p. 100 mg/kg de peso corporal (pc) (Nishikawa, 2002; Olivera, 2001; Malaveille, 1996), .

La preparación de las láminas se realizó siguiendo las pautas de Schmid, 1975 citado por Maluszynska, 2005; Mayer, 2001; Krisma, 2000; Liu, 1998; Martelli, 1998. Después de 30 horas de ser inoculados con los tratamientos respectivos, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Las células de médula ósea del fémur se aislaron en buffer fosfato salino suplementados con BSA al 5 % y posteriormente centrifugados a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y luego se resuspendió en buffer fosfato salino suplementado con buffer salino fosfatado a pH 7.2 (BSA) al 5 %, para luego realizar un *frotis* en las láminas y posteriormente fijarlos en metanol absoluto por 10 minutos. Las láminas se colorearon con colorante Giemsa al 2% por 15 minutos.

El análisis de los micronúcleos se realizó en el microscopio óptico de campo claro a un aumento de 1000X. Se contaron 2000 eritrocitos policromáticos (EP) por cada individuo y se registró la presencia de eritrocitos micronucleados (EPMn). Para descartar cualquier error al momento de contar los eritrocitos policromáticos hay que saber diferenciarlos de residuos como restos de colorantes que pueden precipitar y ocasionalmente pueden interferir al momento de hacer el análisis en el microscopio óptico. Típicamente la morfología de los micronúcleos son redondos y su diámetro es aproximadamente 1/20 a 1/5 de un eritrocito. Para determinar el índice de citotoxicidad se contaron 500 células, identificando los eritrocitos maduros o policromáticos (EP) de los inmaduros o normocromáticos (EN). El índice de citotoxicidad se halla calculando EP/EN.

se usó con el extracto alcohólico de las flores (Vallarino óKelly, 2001; Tzine, 2001; Krishna, 2000; Robbiano, 1998).

Para el análisis estadístico, los datos obtenidos en el estudio fueron procesados mediante el un análisis de varianza ANOVA y con la prueba de KruskalóWallis con un $p > 0.05$.

3.1.9. Determinación de actividad antimicrobiana.

Se usaron cepas ATCC obtenidas del Instituto Nacional de Salud (INS) de especies como *Escherichia coli* **ATCC 10536**, *Pseudomonas aeruginosa* **ATCC 27853**, *Staphylococcus aureus* **ATCC 6538-P**, *Candida albicans* **ATCC 10231**. Además se realizaron pruebas con muestras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas del Hospital Militar para medir su posible efecto antimicrobiano. En todas estas especies se probaron los extractos obtenidos de las hojas y flores. (Murray, 2001; Nagalakshmi, 2001; Sequeira, 1979).

Cada uno de estos microorganismos fue replicado en el medio de cultivo adecuado: Agar TSA (Merck) y Agar Sabouraud Glucosado al 4% (Merck), luego fueron incubados en estufa a 37°C por 24 horas. A partir de este cultivo joven se prepararon los inóculos, por suspensión en agua peptonada estéril (Merck) al 0.1% equivalente al tubo 0,5 de la escala de MacFarland. (IICA, 2005; INEI, 2001; García, 2000).

El screening antimicrobiano se llevó a cabo utilizando el Método Disco-Difusión Kirby-Bauer y el método de los pocillos (Toribio, 2004; Rojas, 2005; García, 2003; Gabriel, 2002; Arana 1987).

3.1.9.1. Método de difusión por discos o Kirby-Bauer

Para esta técnica se usaron placas de agar Muller Hinton para las bacterias y Agar Sabouraud Glucosado al 4% para la levadura, que se deben encontrar a

igual que los discos en el momento de realizar las

Para hacer la inoculación dentro de los 15 minutos de preparado el inóculo se sumergió un hisopo mango largo estéril en la suspensión, luego se escurrió contra las paredes del tubo para eliminar el excedente del líquido, se realizó la siembra con el hisopo en placa entera, en tres direcciones y contra el borde. Se esperó entre 3 a 15 minutos para aplicar los discos.

Para preparar los discos de los extractos se trabajaron con tres concentraciones de 75, 150 y 300 mg/mL de los 3 extractos obtenidos de las hojas y los 3 extractos obtenidos de las flores. Se cortaron discos de 6mm de diámetro de papel filtro Watman # 2 y se esterilizaron; luego estos discos fueron sumergidos en las diferentes concentraciones y dejados a secar por 30 minutos, para su uso.

Para control se usaron discos de antibióticos de la marca BIOLABTEST; para Gram positivos: Vancomicina (30µg/mL), Meticilina (5µg/mL) y Cefalexina (30µg/mL); para Gram negativos: Amikacina (30µg/mL); Imipenen (10µg/mL); Ciprofloxacina (5µg/mL) y Cloranfenicol (30µg/mL); para la levadura se usó como control Nistatina 1millón UI/mL.

Se aplicaron los discos usando pinzas estériles, se presionaron los discos ligeramente contra el agar teniendo cuidado de que guarden una distancia entre sí de 30mm. No se deben recolocar los discos una vez que han tomado contacto con el agar porque la difusión comienza instantáneamente y alteraría los resultados. Se incubaron las placas después de 15 minutos de aplicados los discos por 24 horas a 37°C. y se realizaron las pruebas por triplicado.

Para la lectura de las placas se tuvo en cuenta que el crecimiento de la bacteria sea confluyente en toda la placa, se trabajó en una superficie adecuada para poder observar adecuadamente los halos formados y se procedió a medirlos usando un vernier digital marca Marathon. Luego se procedió a la toma de datos.

lo de los pozos de agar

Placas conteniendo 25 mL de agar Muller Hinton para las bacterias y agar Sabouraud glucosado al 4% para la *Candida* fueron hisopadas con el inóculo, siguiendo la técnica descrita anteriormente. Luego de 15 minutos se realizaron perforaciones de aproximadamente 6 mm de diámetro con un sacabocado estéril y se le inoculó 100 µl de los extractos H1, H2, H3, F1, F2 y F3 a las siguientes concentraciones: 75, 150 y 300mg/mL.

Como antibióticos control se usaron para *E. coli*: cloranfenicol 250mg/mL, ciprofloxacina 250mg/mL y amikacina 250mg/mL; para *S. aureus*: vancomicina 250mg/mL, oxacilina 500mg/mL y cefalexina 250mg/mL; para *P. aeruginosa*: ciprofloxacina 250mg/mL, amikacina 250mg/mL y para *C. albicans*: nistatina 1millón de UI/mL. También se hizo un pocillo control al que se le agregó 100 µL de agua destilada estéril para todos los microorganismos. Adicionalmente se realizaron controles negativos con los solventes utilizados en los extractos, se controló si los solventes tenían actividad antimicrobiana que podrían interferir con la prueba, para ello se realizaron controles para medir actividad antimicrobiana dando resultado negativo. Se dejó reposar por 15 minutos y luego se incubaron por 24 horas a 37°C. La lectura se realizó de igual forma que el método de Kirby Bauer. Se realizaron las pruebas por triplicado. Para analizar los resultados se trabajaron los promedios de los datos obtenidos experimentalmente.

3.1.10. Procesamiento de los datos

Para el procesamiento de la información colectada se usó el programa SPSS 15.0, se utilizaron test no paramétricos (Kruskal Wallis para los resultados obtenidos mediante el ensayo de micronúcleos, que no se ajustaron a una distribución normal. En todos los casos se trabajó con un nivel de significancia menor al 5% ($p < 0,05$). Para el ensayo de *Artemia salina* se trabajó con el programa Probit Finney (Tszinne, 2001; Vallarine-Kelly, 2001; Zotti-Martelli, 2000; Robbianno, 1998).

4.1. Estructura histológica de *Nicotiana paniculata*

Estructura histológica de la raíz.

La raíz de *Nicotiana paniculata* tiene una estructura típica secundaria de dicotiledónea, con presencia de dos zonas bien definidas: zona cortical y un cilindro medular. La zona cortical está constituida por una capa peridérmica amplia corteza secundaria con parénquima reservante, abundantes idioblastos de arenilla cristalífera, cercano al floema secundario. El cambium vascular está formado por dos a cuatro hileras de células poco visibles, de forma rectangular, paredes delgadas y dispuestas una a continuación de otra. El cilindro central presenta abundante xilema secundario y parénquima leñoso (Fig. 6 - 8).

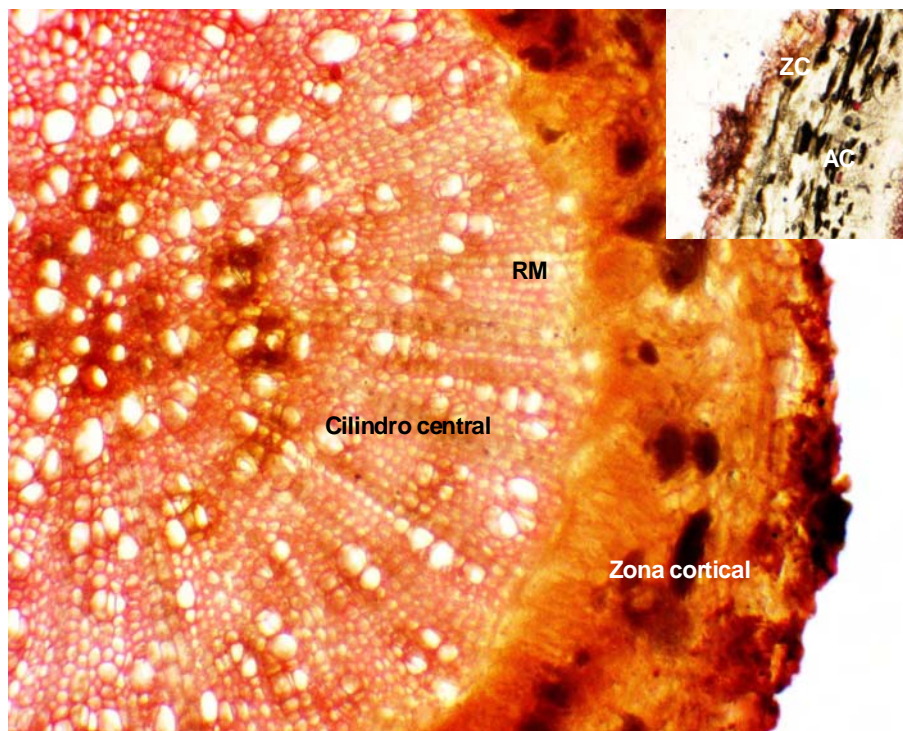


Fig. N° 6. Corte transversal de raíz de *Nicotiana paniculata*.

A. 40x. RM: radios medulares. B. 80X. ZN: zona cortical, AC: arenilla cristalífera. Coloración safranina.

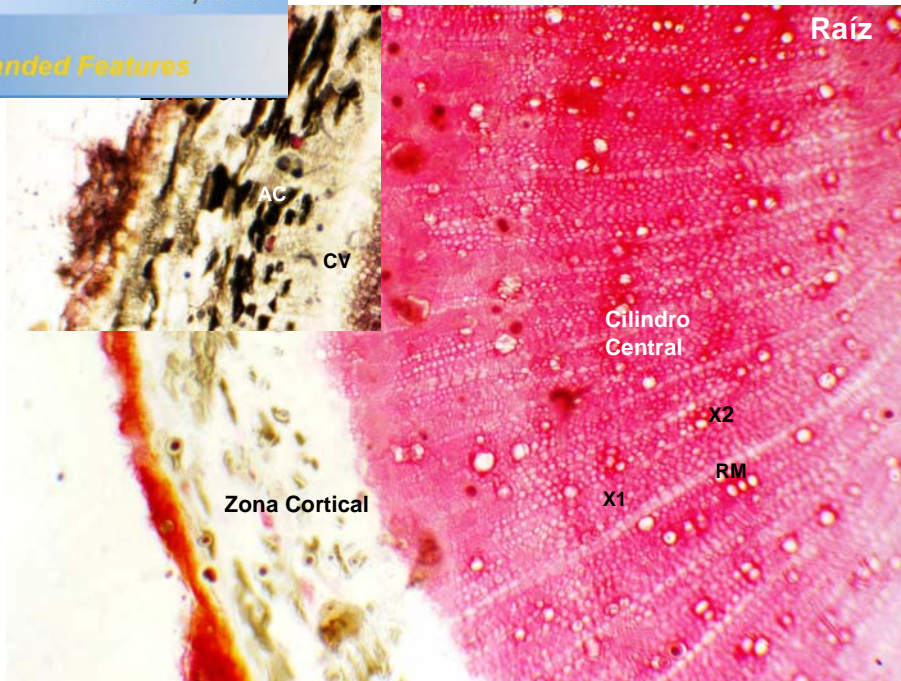


Fig. Nº 7. Corte transversal de raíz de *Nicotiana paniculata*. A: 40x. RM: radios medulares X1: xilema primario, X2:xilema secundario. B: 80X. AC: arenilla cristalífera., CV: cambium vascular. Coloración safranina.

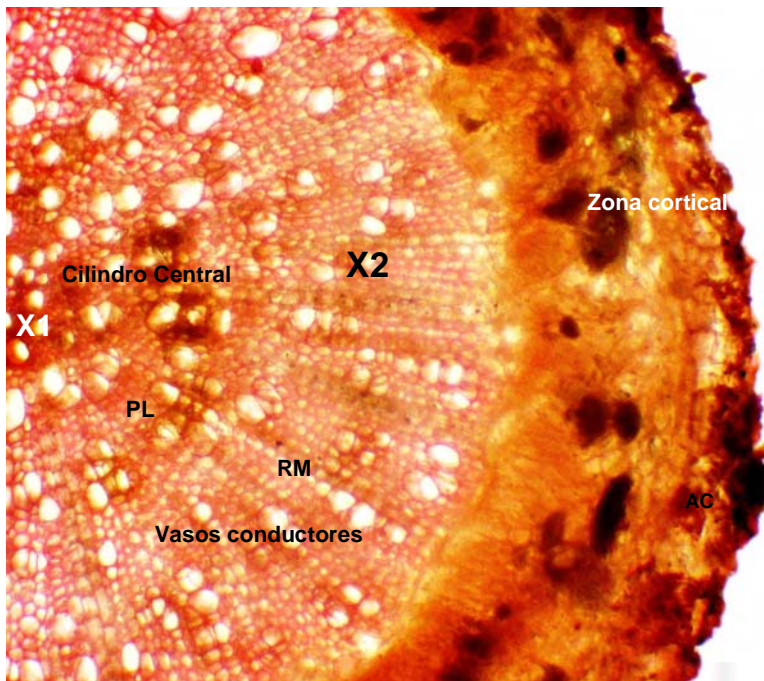


Fig. Nº 8 . Corte transversal de raíz de *Nicotiana paniculata*. 40x. RM: radios medulares, X1: xilema primario, X2: xilema secundario, PL :parénquima leñoso. Coloración safranina.

tallo

La estructura primaria del tallo de *Nicotiana paniculata* presenta una epidermis uniseriada con presencia de tricomas tectores (cónicos) y glandulares pluricelulares. Los tricomas tectores son pluricelulares, de paredes delgadas y de punta no muy aguda. Los tricomas glandulosos también son pluricelulares con células de forma rectangular y de paredes normales. La corteza está constituida por cuatro hileras de colénquima angular, algunas capas de parénquima clorofiliano y parénquima incoloro formado por hileras de células de paredes delgadas; con inclusiones citoplasmáticas que generalmente está constituido por abundante arenilla cristalífera. El floema primario en forma de pequeños paquetes de fibras, zona procambial y xilema primario continuo presenta radios medulares poco diferenciados. En la médula presencia de parénquima incoloro e idioblastos aislados de arenilla cristalífera (Fig. 9 - 11).

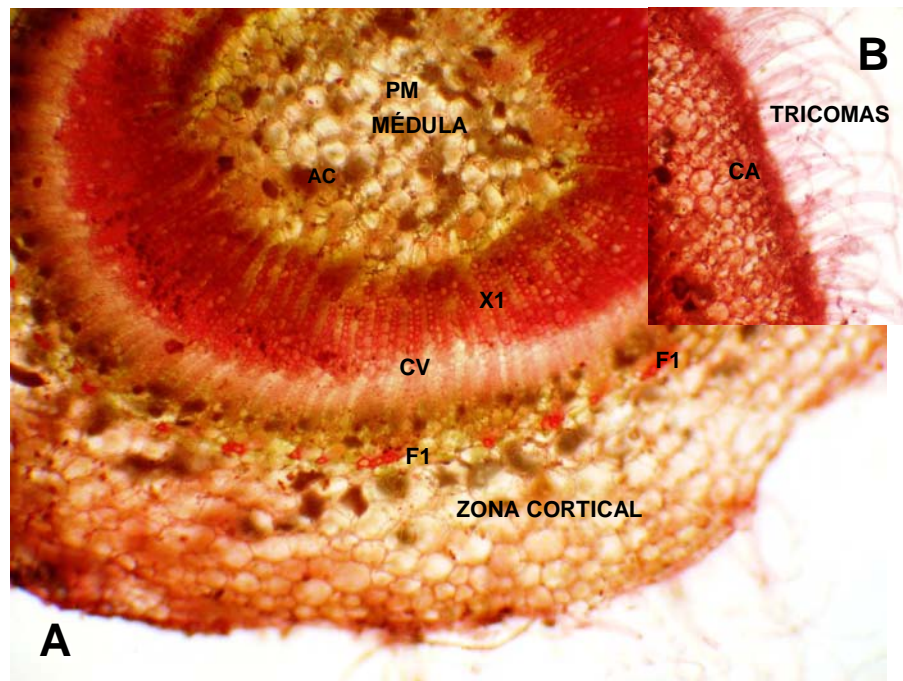


Fig. N° 9. Corte transversal de tallo de *Nicotiana paniculata*. A: 40X. F1: floema primario, CV: cambium vascular, AC: arenilla cristalífera, PM: parénquima medular. B: 80X. Detalle de los tricomas, CA: colénquima angular. Coloración safranina.

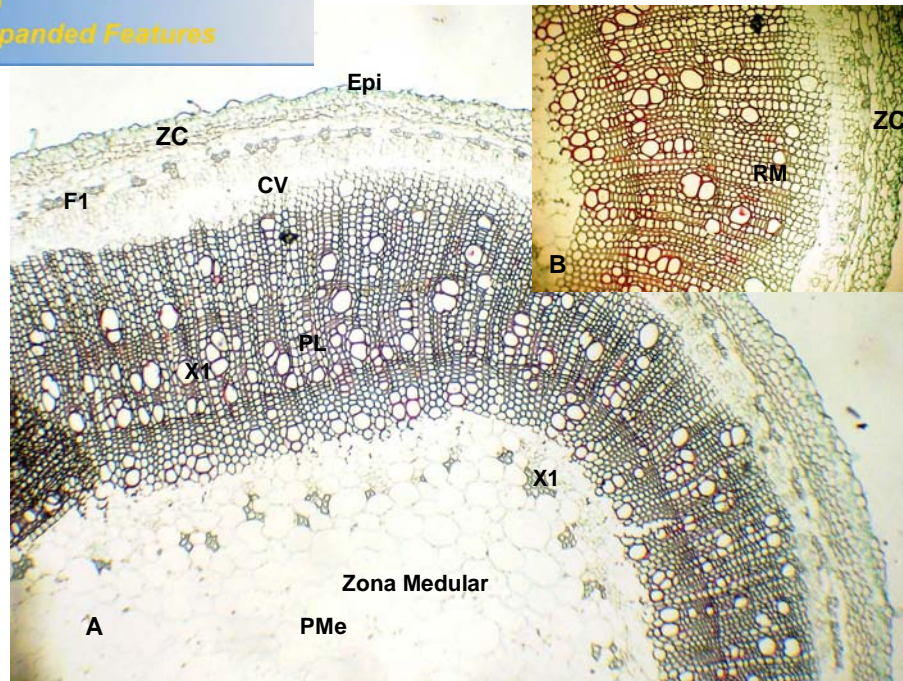


Fig. Nº 10. Corte transversal de tallo de *Nicotiana paniculata*. A: 40X. ZC: Zona cortical, F1: floema primario, CV: cambium vascular, PL: parénquima leñoso, X1: xilema primario, PMe: parénquima medular. B. 50X : PM: parénquima medular, ZC: zona cortical. Coloración azul de toluidina.

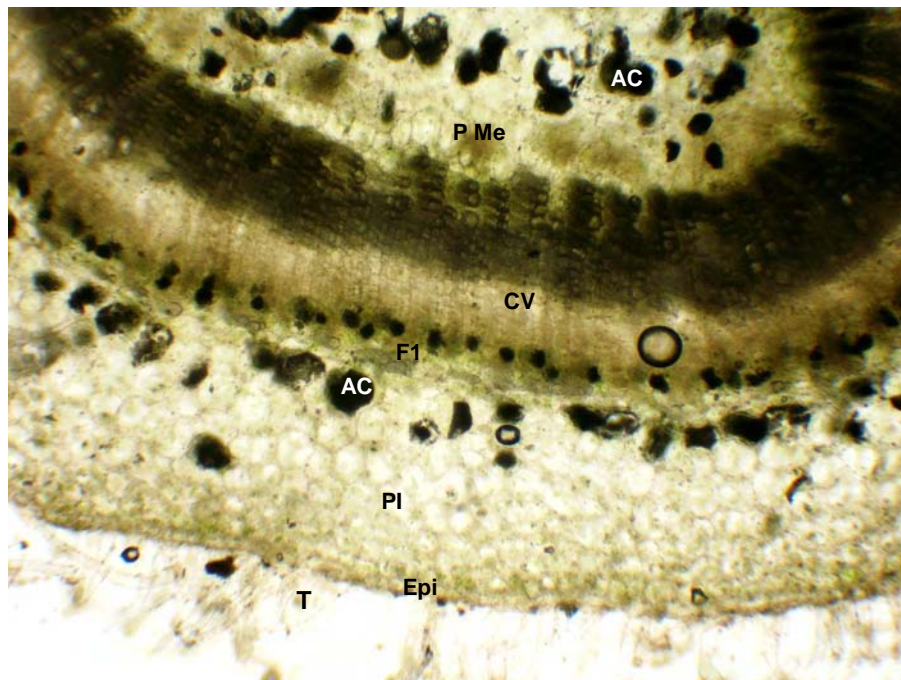


Fig. Nº 11. Corte transversal de tallo de *Nicotiana paniculata*. A: 40X. Epi: epidermis, PI: parénquima incoloro, AC: Arenilla cristalífera, CV: cambium vascular, PMe: parénquima medular.

la hoja

Hoja de estructura bifacial de dicotiledónea, con una epidermis uniseriada, que presenta una gran cantidad de tricomas cónicos y glandulares pluricelulares dispuestos sobre ambas superficies de la hoja, tricomas pluricelulares de tipo glandular hacia la superficie adaxial y una delgada capa cuticular. El mesófilo está compuesto por una capa de células parenquimáticas clorofilianas en empalizada seguida del parénquima lagunar. idioblastos conteniendo cristales de arenilla cristalífera están presentes en el medio del mesófilo (Fig. 12).

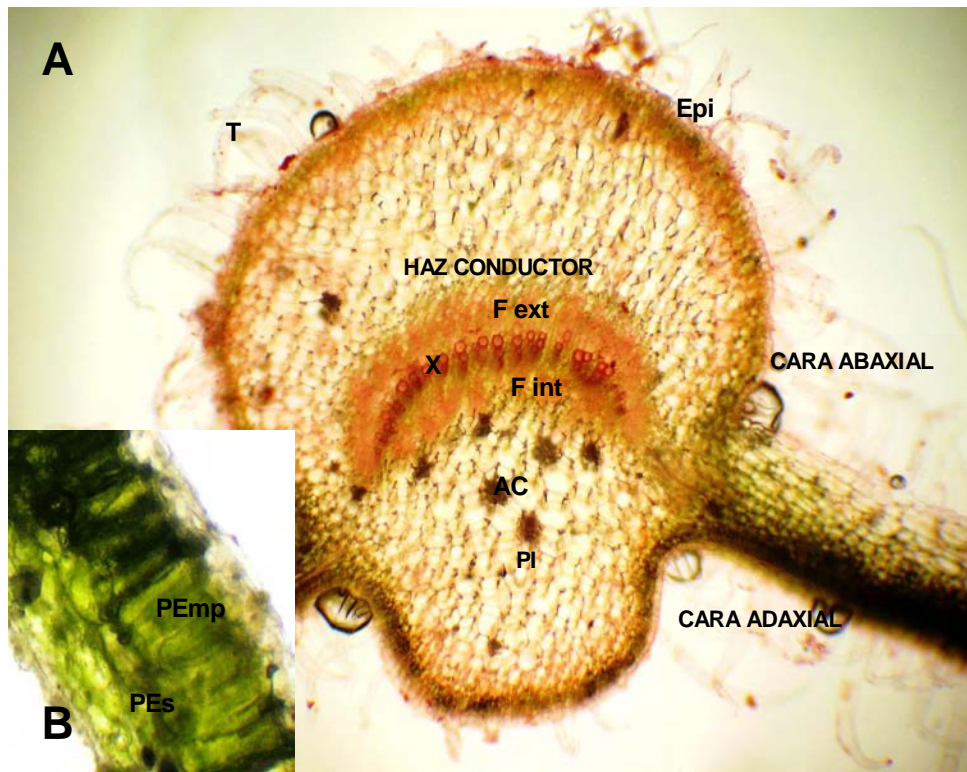


Fig. Nº 12. Corte transversal de hoja de *Nicotiana paniculata*. Zona de la nervadura central. A 40X. T: tricomas, Epi: epidermis, F ext: Floema externo, X: xilema, F int: floema interno, AC: arenilla cristalífera, PI: parénquima incoloro. Coloración safranina. B 100X. PEs: parénquima en Empalizada, EEs: parénquima esponjoso.

la humedad

de las pruebas realizadas en *Nicotiana paniculata* nos muestran que el porcentaje de humedad promedio de la planta completa es de 90.87%, mientras que de las hojas solamente es de 89.78%, y en las flores es de 86.35%.

4.3. Screening fotoquímico

Se ha realizado el screening fitoquímico de los extractos extraídos (hojas y flores) de *Nicotiana paniculata* L, para obtener información de sus constituyentes químicos siguiendo las técnicas fitoquímicas establecidas (Bonilla, 2002; Chifa, 2002; Endermoglul, 2001; Lock, 1998; Galindo, 1989; Domínguez, 1973), que se muestran en la tabla N°1.

Tabla N° 1. Resultados Screening fitoquímico de *Nicotiana paniculata* L

Pruebas	Extractos					
	H1	H2	H3	F1	F2	F3
Reactivo de NaOH (quinonas)	-	-	-	-	-	+
Reactivo de Nihidrina (aa libres)	-	-	-	-	-	-
Reactivo de gelatina (Taninos)	++	++	+++	++	++	+++
Reactivo de Tricloruro de hierro (compuestos fenólicos)	+	+	+	+	+	+++
Reactivo de Mayer (Alcaloides)	+++	+++	+++	+++	+/-	++
Reactivo de Dragendorff (alcaloides)	++	++	++	+	-	+
Reactivo de Shinoda (Flavonoides)	-	-	++	-	-	++
Reactivo de Molish (Glicosidos)	+	+	+	+	+	++
Reactivo de Lieberman (Terpenos o esteroides)	+	+	+	+	+	+
Reactivo 2,4 dinitrofenilhidracina (carbonilos)	+	-	+	+	+	+
Control	-	-	-	-	-	-

H1: extracto de hojas en éter de petróleo
 H3: extracto de Hojas en alcohol de 60%
 F2: Extracto de flores en acetato de etilo
 Trazas +

Reacción positiva

H2: extracto de hojas en acetato de etilo
 F1: extracto de flores en éter de petróleo
 F3: extracto de flores en alcohol de 60%
 Pequeñas cantidades ++

Reacción negativa -

Método de reconocimiento de metabolitos secundarios
Nicotiana paniculata L.

Muestra problema 2	Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Nicotiana paniculata</i> L
Soporte	Placas de Sílica Gel 60 F 254 (MERCK)
Sistema de solventes	Metanol 1: Diclorometano 3
Reveladores	Luz UV: Reactivo de Tricloruro de Hierro, que determinó la presencia de fenoles encontrándose en F3 Manchas más intensas. Con el reactivo de Dragendorff se observaron manchas mas intensas en H3

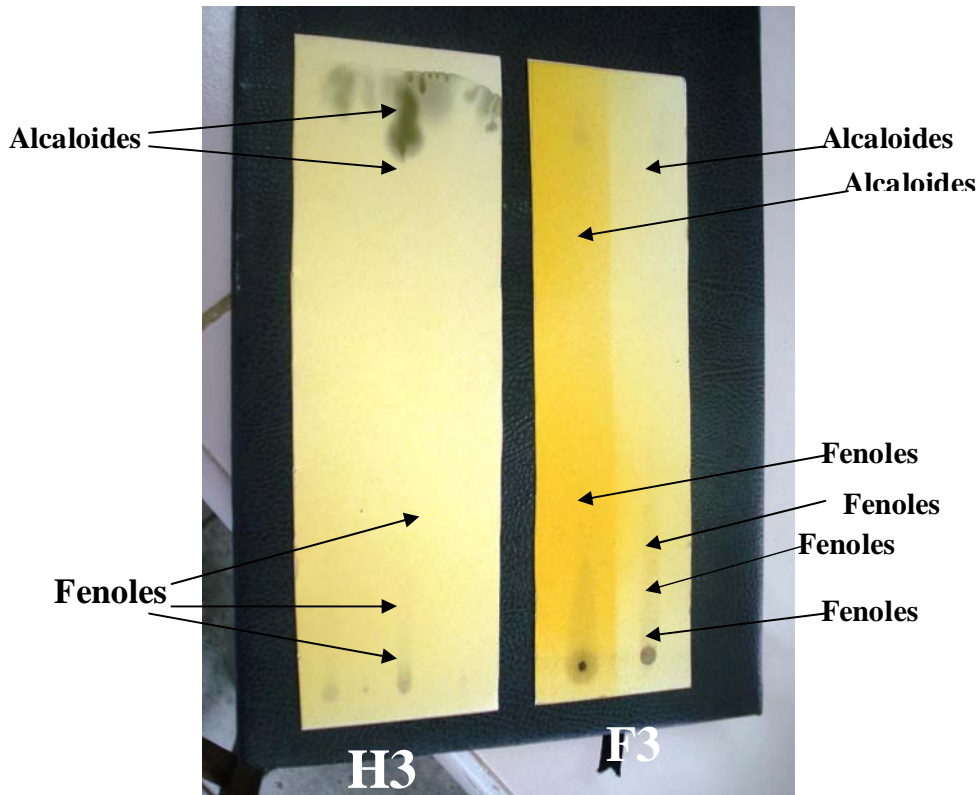


Fig. Nº 13. Cromatografía: separación e identificación
 de metabolitos secundarios

Según la marcha fitoquímica cuyos resultados se muestran en la tabla Nº1, todos los extractos ensayados presentan taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, glucósidos y terpenoides, además de esteroides en menor cantidad.

Como los extractos hidroalcohólicos de hojas y flores (H3 y F3) presentan compuestos fenólicos y alcaloides se realizaron ensayos cromatográficos en capa fina para determinar el número de metabolitos secundarios. Se encontró que F3 posee cuatro compuestos fenólicos y 2 alcaloides y el extracto H3 posee tres

por lo menos dos alcaloides tal como se observa en la

4.4. Determinación de CL⁵⁰

Los resultados de la prueba con *Artemia salina* son:

Tabla N°3 . Resultados de toxicidad del extracto hidroalcohólico de flores de *Nicotiana paniculata* L í tabaco cimarrón

Especie	% de muertes en 24 horas			CL ⁵⁰ (µg/mL)
	10µg/mL	100µg/mL	1000µg/mL	
<i>Nicotiana paniculata</i> Ext. hidroalcohólico	6	24	42	980

Tabla N° 4. Resultados de toxicidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Nicotiana paniculata* L í tabaco cimarrón

Especie	% de muertes en 24 horas			CL ⁵⁰ (µg/mL)
	10µg/mL	100µg/mL	1000µg/mL	
<i>Nicotiana paniculata</i> Ext. hidroalcohólico	8	23	40	1100

4.5 Ensayos de citotoxicidad

4.5.1 Estudio de citotoxicidad

No se registró en ninguno de los métodos toxicológicos muertes u otras manifestaciones de signos de efectos adversos antes de trabajar con los animales. Los índices de citotoxicidad se hallaron identificando los eritrocitos maduros (azules) o policromáticos (EP) de los inmaduros (rojos) o normocromáticos (EN) y se registró la presencia de eritrocitos micronucleados (EPMn) (Fig. 14)

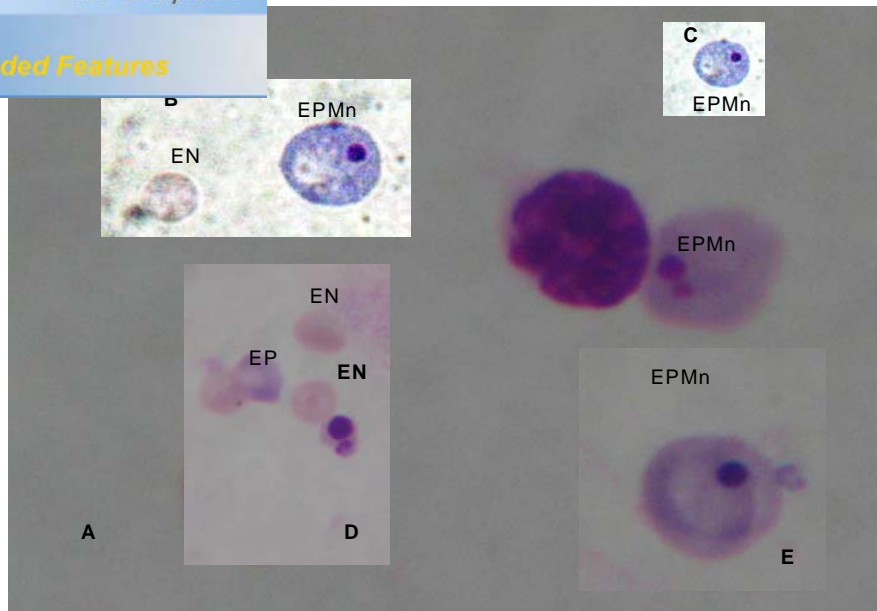


Fig. N° 14. Microfotografía de células de médula ósea de ratón. A, B, C, D, E : Eritrocito policromático con micronúcleo (EPMn), eritrocito Normocromático (EN), eritrocito policromático (EP). (1000X).

Los resultados de los índices de citotoxicidad en ratones machos y hembras con extractos hidroalcohólico de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* son como los mostramos en las siguientes tablas (Tabla 5- 8).

Tabla N° 5. Resultados de Índices de Citotoxicidad en ratones machos con extractos hidroalcohólico de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

Grupo	CN	Trat I	Trat II	Trat III	CP	Total
Nº	5	5	5	5	5	25
Media ±SE	3,40±0,50	0,62±0,03*	0,52±0,05*	0,30±0,02*	0,76±0,15*	1,13±0,19

Prueba no Paramétrica de Kruskal-Wallis. * diferencia significativa $p < 0.05$; entre CN y cada grupo tratamiento y CP.

Tabla N° 6. Resultados de Índices de Citotoxicidad en ratones hembras con extractos hidroalcohólico de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

Grupo	CN	Trat I	Trat II	Trat III	CP	Total
Nº	5	5	5	5	5	25
Media ±SE	3,25±0,39	0,93,40±0,23*	0,80±0,09*	0,75±0,07*	0,85±0,13*	1,32±0,16

Prueba no Paramétrica de Kruskal-Wallis. * diferencia significativa $p < 0.05$; entre CN y cada grupo tratamiento y CP.

**os de Índices de Citotoxicidad en ratones machos
alcohólico de flores de *Nicotiana paniculata* L.**

Grupo	CN	Trat I	Trat II	Trat III	CP	Total
Nº	5	5	5	5	5	25
Media ±SE	4,07±0,14	0,67±0,21*	0,60±0,06*	0,31±0,05*	0,67±0,30*	1,31±1,47

Prueba no Paramétrica de Kruskal-Wallis. * diferencia significativa p<0.05; entre CN y cada grupo tratamiento y CP.

Tabla Nº 8. Resultados de Índices de Citotoxicidad en ratones hembras con extractos hidroalcohólico de flores de *Nicotiana paniculata* L.

Grupo	CN	Trat I	Trat II	Trat III	CP	Total
Nº	5	5	5	5	5	25
Media ±SE	2,99±0,26	0,86±0,09*	0,82±0,07*	0,81±0,09*	0,64±0,09*	1,22±0,14

Prueba no Paramétrica de Kruskal-Wallis. * diferencia significativa p<0.05; entre CN y cada grupo tratamiento y CP.

4.5.2. Genotoxicidad *in vivo*

Los resultados de frecuencia de micronúcleos (MN) por cada 2000 eritrocitos de ratón se observan en las tablas 9 - 12.

Tabla Nº 9. Resultados de frecuencias de MN en ratones machos con extractos hidroalcohólico de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

Grupo	CN	Trat I	Trat II	Trat III	CP	Total
Nº	5	5	5	5	5	25
Media ±SE	4,6±0,81	12,2±1,88*	21,8±0,86*	27,8±2,53*	27,8±4,31*	18,84±2,11

Prueba no Paramétrica de Kruskal-Wallis. * diferencia significativa p<0.05; entre CN y cada grupo tratamiento y CP.

Tabla Nº 10. Resultados de frecuencias de MN en ratones hembras con extractos hidroalcohólico de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

Grupo	CN	Trat I	Trat II	Trat III	CP	Total
Nº	5	5	5	5	5	25
Media ±SE	4,0±0,83	7,8±1,15*	22,0±0,89*	24,2±3,21*	28,8±2,31*	18,84±2,11

Prueba no Paramétrica de Kruskal-Wallis. * diferencia significativa p<0.05; entre CN y cada grupo tratamiento y CP.

s de frecuencias de MN en ratones machos con
alcoholico de flores de *Nicotiana paniculata* L.

Grupo	CN	Trat I	Trat II	Trat III	CP	Total
Nº	5	5	5	5	5	25
Media						
±SE	2,6±0,81	11,2±0,668*	20±0,54*	37,8±2,19*	31,4±2,87*	20,44±2,67

Prueba no Paramétrica de Kruskal-Wallis. * diferencia significativa p<0.05; entre CN y cada grupo tratamiento y CP.

Tabla Nº 12. Resultados de frecuencias de MN en ratones hembras con Extractos hidroalcohólico de flores de *Nicotiana paniculata* L.

Grupo	CN	Trat I	Trat II	Trat III	CP	Total
Nº	5	5	5	5	5	25
Media						
±SE	1,6±0,51	7,8±0,58*	18,6±0,40*	32,2±2,85*	35,4±1,63*	19,12±2,76

Prueba no Paramétrica de Kruskal-Wallis. * diferencia significativa p<0.05; entre CN y cada grupo tratamiento y CP.

4.6. Determinación de actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana de *Nicotiana paniculata* òtabaco cimarrónö, se ha determinado por dos métodos: el método de discos difusión o método de Kirby-Bauer y el método de excavación o pocillos. En ambos métodos se ha medido los halos de inhibición del crecimiento microbiano en milímetros (mm).

4.6.1. Método Kirby-Bauer.

Los siguientes resultados expresan la acción de los extractos de *Nicotiana paniculata* sobre el crecimiento de microorganismos usando el método de Kirby ó Bauer.

a) *Escherichia coli*

Tabla Nº 13. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* con tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			CIP	MK	CHL	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	40,31±3,57	33,8±2,65	29,77±1.9	0,00

H1: extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina
CHL: Cloranfenicol

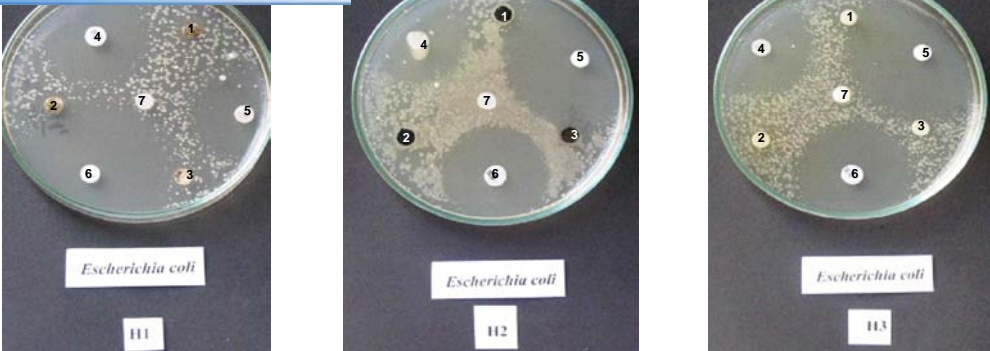


Fig. Nº 15. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana paniculata* L en *Escherichia coli*. H1: extracto en éter de petróleo, H2: extracto en acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL. 4: CIP, 5: MK, 6: CHL, 7: control. Método Kirby-Bauer.

Tabla Nº 14. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			CIP	MK	CHL	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	40,31±3,57	33,8±2,65	29,77±1.9	0,00

F1: extracto éter de petróleo
 F2: extracto de acetato de etilo
 F3: extracto hidroalcohólico

CIP: Ciprofloxacina
 MK: Amikacina
 CHL: Cloranfenicol



Fig. Nº 16. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Escherichia coli*. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL. 4: CIP, 5: MK, 6: CHL, 7: control. Método Kirby-Bauer.

aureus

Tabla N° 15. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			VA	MET	CLX	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	16,99±0,87	36,39±2,97	12,95±2,89	0,00

H1: extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

VA: Vancomicina
MET: Meticilina
CLX: Cefalexina

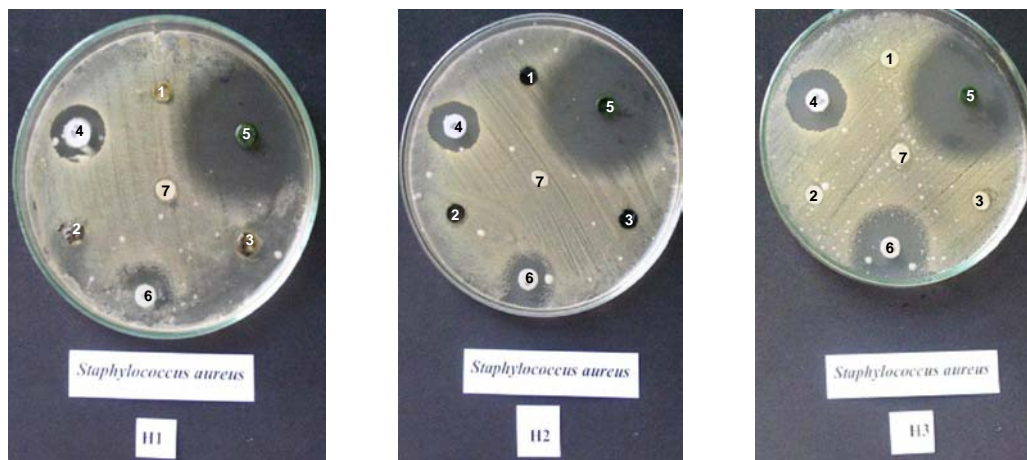


Fig. N° 17. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana paniculata* L en *Staphylococcus aureus*. H1: extracto en éter de petróleo, H2: extracto en acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL. 4: VA, 5: MET, 6: CLX, 7: control. Método Kirby-Bauer

Tabla N° 16. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			VA	MET	CLX	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	16,99±0,87	36,39±2,97	12,95±2,89	0,00

F1: extracto éter de petróleo
F2: extracto de acetato de etilo
F3: extracto hidroalcohólico

VA: Vancomicina
MET: Meticilina
CLX: Cefalexina

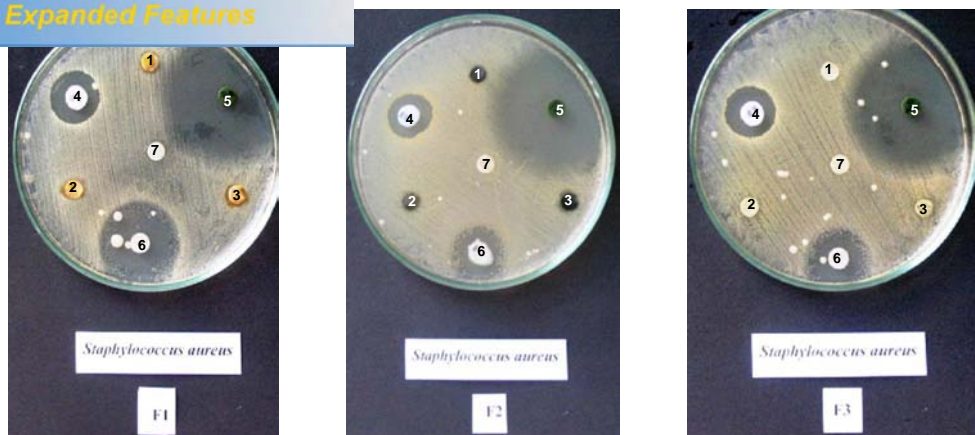


Fig. N° 18. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Staphylococcus aureus*. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL. 4: VA, 5: MET, 6: CLX, 7: control. Método Kirby-Bauer.

c) *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla N° 17. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* con tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			IP M	CIP	MK	Control Negativ o
75mg/m L	150mg/ mL	300mg/ mL	75mg/m L	150mg/ mL	300mg/ mL	75mg/m L	150mg/ mL	300mg/ mL				
10,86	12,67	16,85	8,17	9,44	11,25	12,42	13,58	16,10	0,0 0	34,70±5, 16	21,78±2, 31	0,00

H1: extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

IPM: Imipenem
CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina

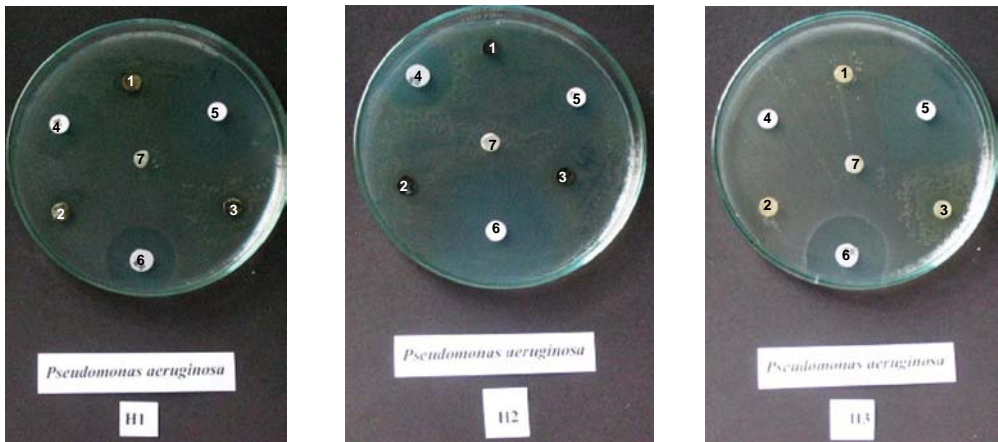


Fig. N° 19. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana paniculata* L en *Pseudomonas aeruginosa*. H1: extracto em éter de petróleo, H2: extracto em acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL, 4: IPM, 5: CIP, 6: MK, 7: control. Método Kirby-Bauer

Halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas* con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			IPM	CIP	MK	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,37	10,94	11,09	0,00	34,70±5,16	21,78±2,31	0,00

F1: extracto éter de petróleo
F2: extracto de acetato de etilo
F3: extracto hidroalcohólico

IPM: Imipenen
CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina

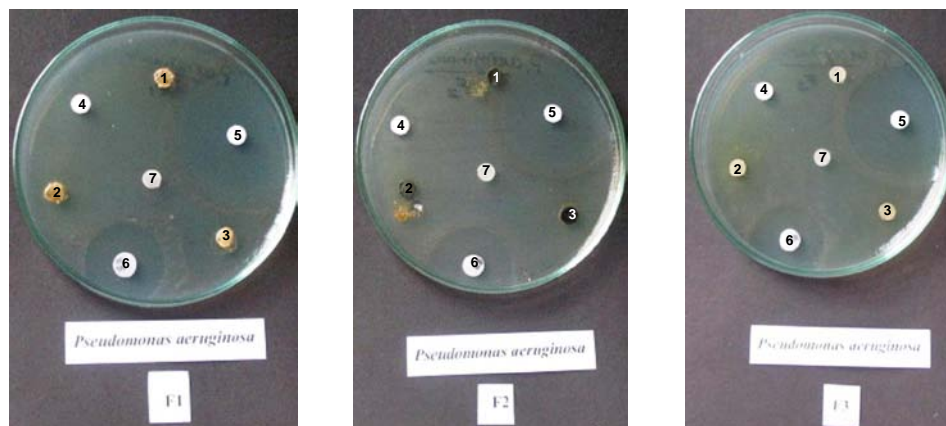


Fig. Nº 20. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Pseudomonas aeruginosa*. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL, 4: IPM, 5: CIP, 6: MK, 7: control. Método Kirby-Bauer

d) *Pseudomonas aeruginosa* HM

Tabla Nº 19. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* HM con tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			IPM	CIP	MK	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	16,10	0,00	36,82±3,4	22,56±2,21	0,00

H1: extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

IPM: Imipenen
CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina

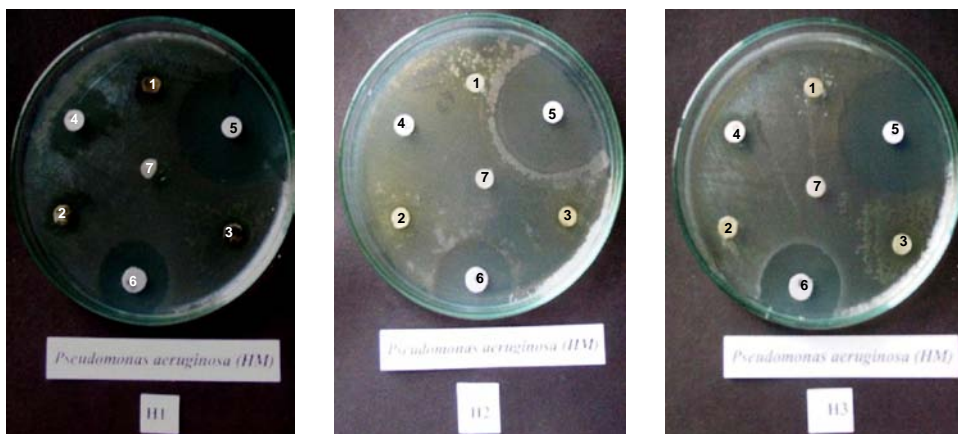


Fig. Nº 21. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana aniculata* L en *Pseudomonas aeruginosa* HM. H1: extracto obtenido usando éter de petróleo, H2: extracto obtenido usando acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL. 4: IPM, 5: CIP, 6: MK, 7: control. Método Kirby-Bauer

Tabla Nº 20. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* HM con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			IPM	CIP	MK	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,92	0,00	36,82±3,4	22,56±2,21	0,00

F1: extracto éter de petróleo
F2: extracto de acetato de etilo
F3: extracto hidroalcohólico

IPM: Imipenem
CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina

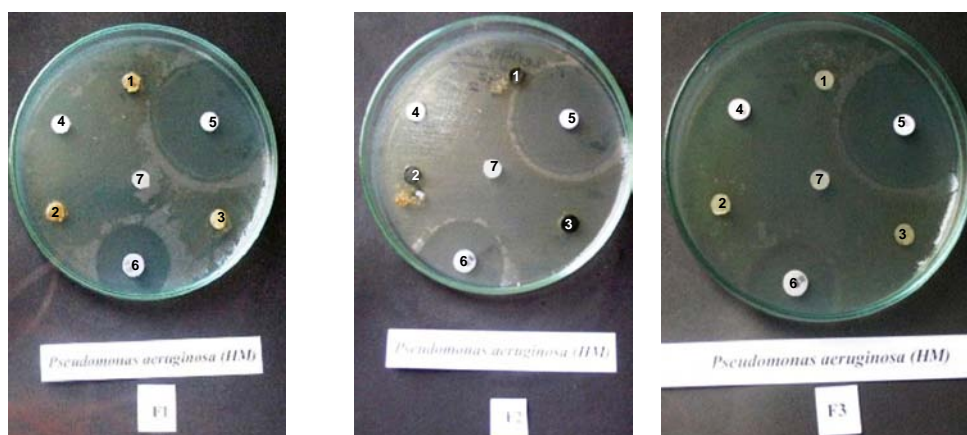


Fig. Nº 22. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Pseudomonas aeruginosa* HM. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL. 4: IPM, 5: CIP, 6: MK, 7: control. Método Kirby-Bauer

e) *Candida albicans*

Tabla Nº 21. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			Nistatina	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,06±1,01	0,00

H1: extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

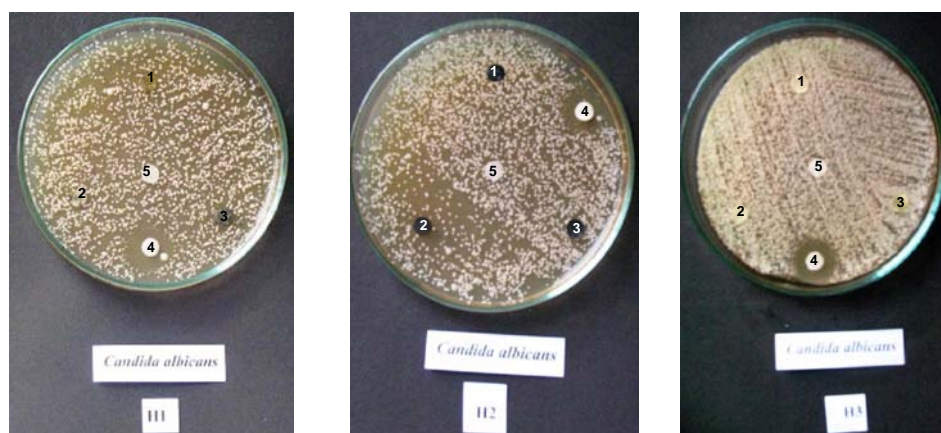


Fig. Nº 23. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana paniculata* L en *Candida albicans*. H1: extracto en éter de petróleo, H2: extracto en acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/ml, 2: 150mg/ml, 3: 300mg/ml, 4: Nistatina, 5: control. Método de Kirby-Bauer.

Tabla Nº 22. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			Nistatina	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,06±1,01	0,00

extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

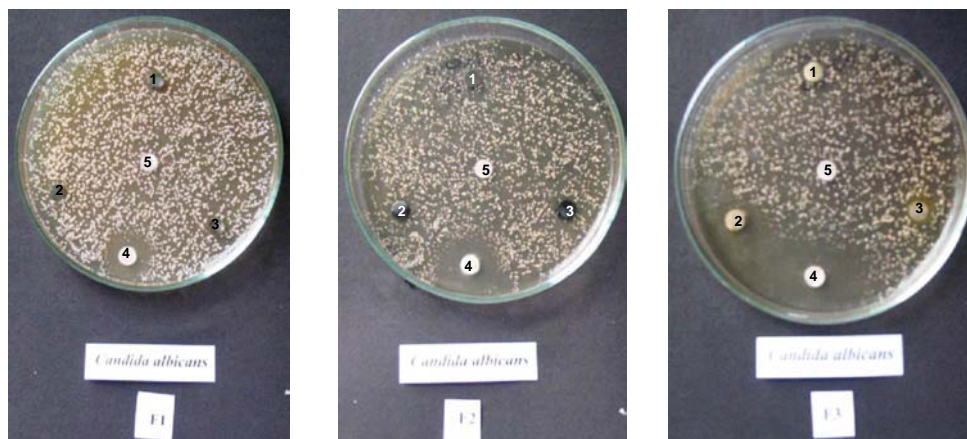


Fig. N° 24. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Candida albicans*. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL, 4: Nistatina, 5: control. Método de Kirby-Bauer.

4.6.2. Método de los pocillos.

Los siguientes resultados expresan la acción de los extractos de *Nicotiana paniculata* sobre el crecimiento de microorganismos usando el método de los pocillos o excavación.

a) *Escherichia coli*

Tabla N° 23. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* con tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			CIP	MK	CHL	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,32	9,38	48,44±2,38	40,64±3,86	46,12±3,18	0,00

H1: extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina
CHL: Cloramfenicol

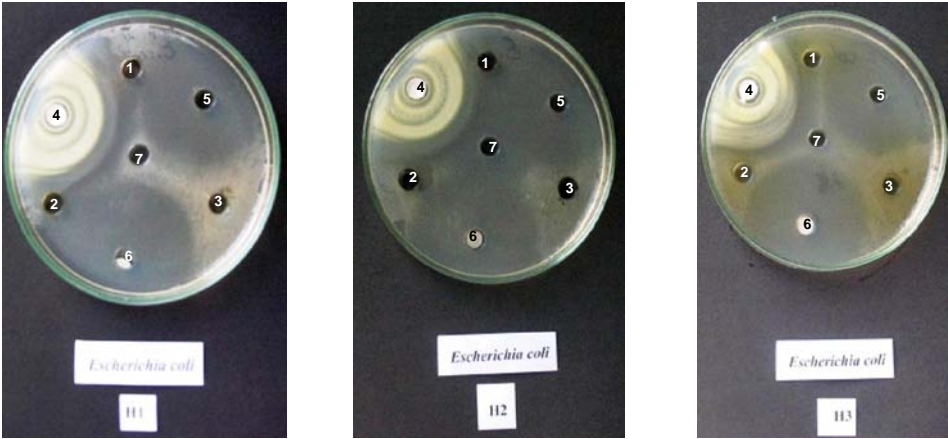


Fig. Nº 25. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana paniculata* L en *Escherichia coli*. H1: extracto en éter de petróleo, H2: extracto en acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL. 4: CIP, 5: MK, 6: CHL, 7: control. Método de los pocillos.

Tabla Nº 24. Diámetro del halo inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			CIP	MK	CHL	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,83	15,65	48,44±2,38	40,64±3,86	46,12±3,18	0,00

F1: extracto éter de petróleo
F2: extracto de acetato de etilo
F3: extracto hidroalcohólico

CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina
CHL: Cloramfenicol



Fig. Nº 26. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Escherichia coli*. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/ml, 2: 150mg/ml, 3: mg/ml., 4: CIP, 5: MK, 6: CHL, 7: control. Método de los pocillos.

b) *Staphylococcus aureus*

Tabla N° 25. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			VA	OXA	CLX	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,12	10,02	13,05	33,50±1,08	42,31±4,08	42,96±1,65	0,00

H1: extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

VA: Vancomicina
OXA: Oxacilina
CLX: Cefalexina

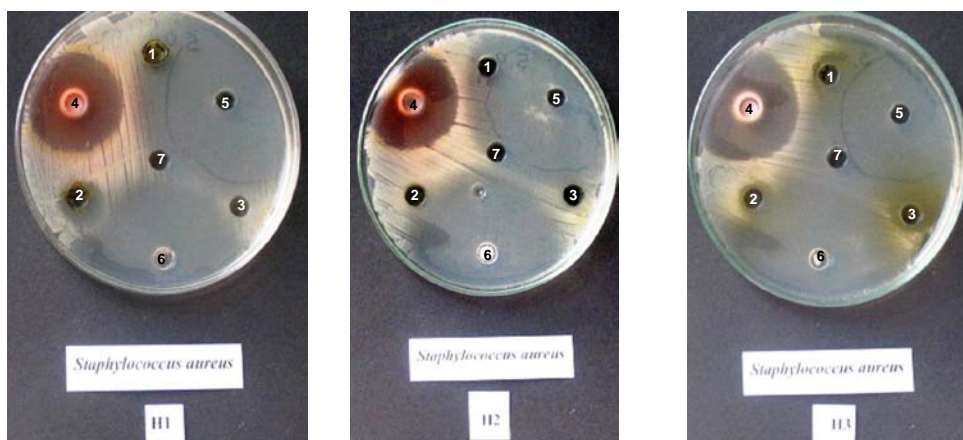


Fig. N° 27. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana paniculata* L en *Staphylococcus aureus*. H1: extracto en éter de petróleo, H2: extracto en acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL, 4: VA, 5: OXA, 6: CLX, 7: control. Método de los pocillos.

Tabla N° 26. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			VA	OXA	CLX	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL				
9,63	10,43	16,88	12,33	11,79	14,25	16,95	16,45	18,49	33,50±1,08	42,31±4,08	42,96±1,65	0,00

F1: extracto éter de petróleo
F2: extracto de acetato de etilo
F3: extracto hidroalcohólico

VA: Vancomicina
OXA: Oxacilina
CLX: Cefalexina

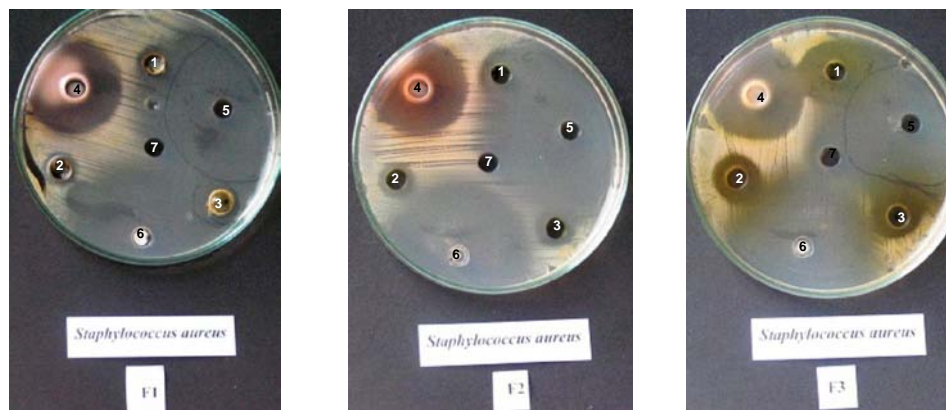


Fig. N° 28. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Staphylococcus aureus*. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/ml, 2: 150mg/ml, 3: 300mg/ml. 4: VA, 5: MET, 6: CLX, 7: control. Método de los pocillos.

c) *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla N° 27. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* con tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			CIP	MK	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL			
10,76	14,68	18,75	0,00	0,00	0,00	20,52	19,94	22,27	37,22±1,65	39,95±3,71	0,00

H1: extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina



Fig. N° 29. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana paniculata* L en *Pseudomonas aeruginosa*. H1: extracto en éter de petróleo, H2: extracto en acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL, 4: CIP, 5: MK, 6: control. Método de los pocillos.

Halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			CIP	MK	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL			
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,93	12,60	13,93	37,22±1,65	39,95±3,71	0,00

F1: extracto éter de petróleo
F2: extracto de acetato de etilo
F3: extracto hidroalcohólico

CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina

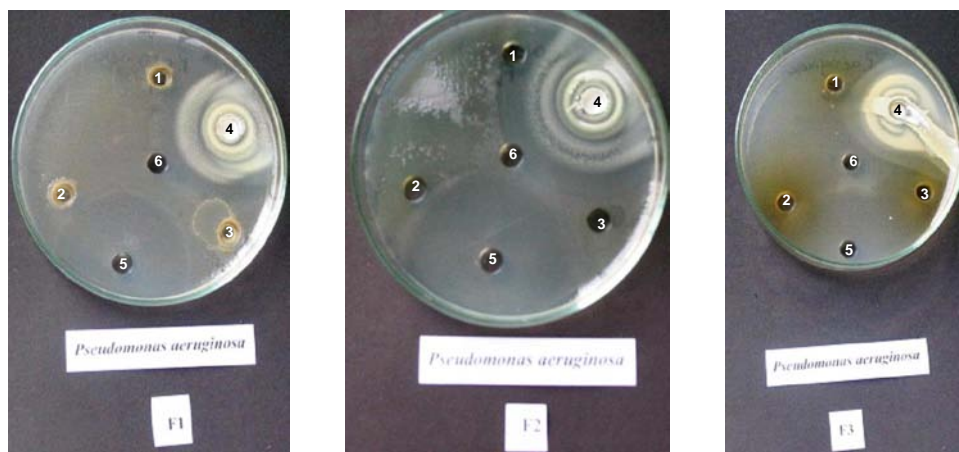


Fig. N° 30. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Pseudomonas aeruginosa*. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL, 4:CIP, 5: MK, 6: control. Método de los pocillos.

d) *Pseudomonas aeruginosa* HM

Tabla N° 29. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* HM con tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			CIP	MK	Control Negativo
75mg/ml	150mg/ml	300mg/ml	75mg/ml	150mg/ml	300mg/ml	75mg/ml	150mg/ml	300mg/ml			
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,90	9,83	10,70	37,22±1,65	24,81±1,02	0,00

H1: extracto éter de petróleo
H2: extracto de acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina

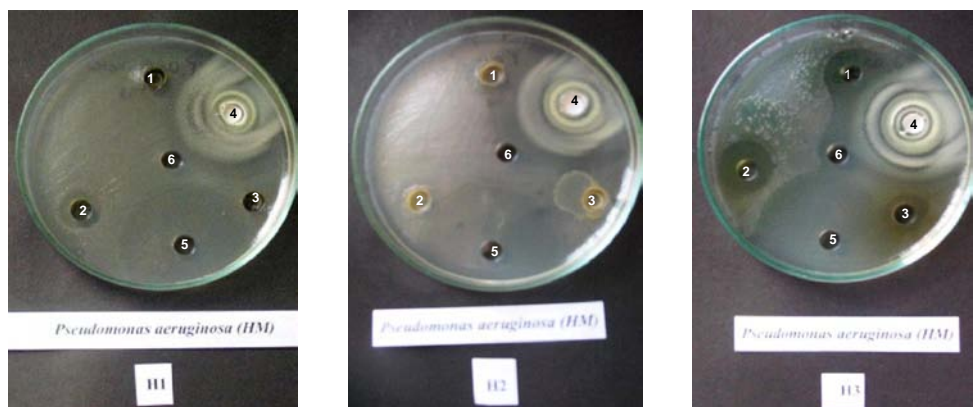


Fig. N° 31. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana paniculata* L en *Pseudomonas aeruginosa* HM. H1: extracto en éter de petróleo, H2: extracto en acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/ml, 2: 150mg/ml, 3: 300mg/ml. 4:CIP, 5: MK, 6: control. Método de los pocillos.

Tabla N° 30. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* HM con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			CIP	MK	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL			
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,87	10,43	14,92	37,22±1,65	24,81±1,02	0,00

F1: extracto éter de petróleo
F2: extracto de acetato de etilo
F3: extracto hidroalcohólico

CIP: Ciprofloxacina
MK: Amikacina

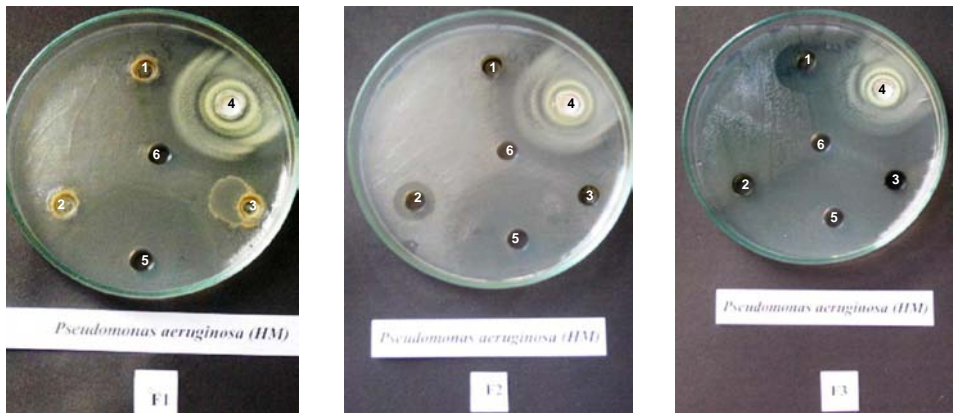


Fig. N° 32. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Pseudomonas aeruginosa* HM. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/ml, 2: 150mg/ml, 3:300mg/ml. 4:CIP, 5: MK, 6: control. Método de los pocillos.

Tabla N° 31. Diámetro de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con tres extractos de hojas de *Nicotiana paniculata* L.

H1			H2			H3			Nistatina	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,41	8,17	9,21	10,10	18,60±1,50	0,00

H1: extracto éter de petróleo

H2: extracto de acetato de etilo

H3: extracto hidroalcohólico

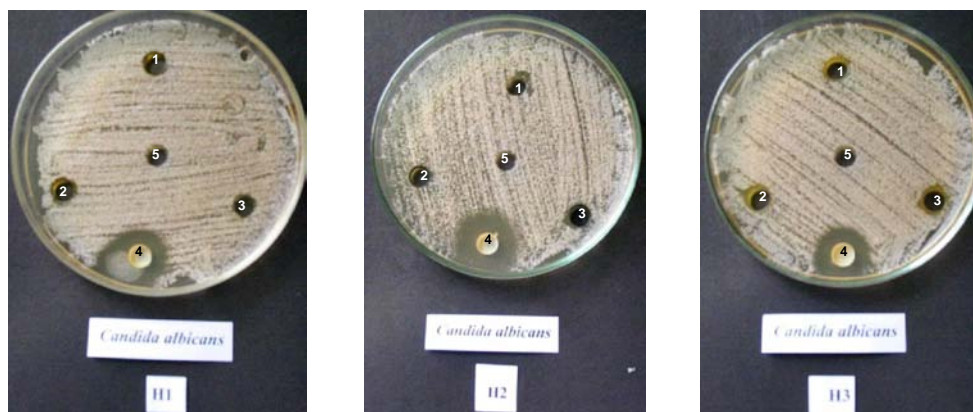


Fig. N° 33. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las hojas de *Nicotiana paniculata* L en *Candida albicans*. H1: extracto en éter de petróleo, H2: extracto en acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/mL, 2: 150mg/mL, 3: 300mg/mL, 4: Nistatina, 5: control. Método de de los pocillos.

Tabla N° 32. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con tres extractos de flores de *Nicotiana paniculata* L.

F1			F2			F3			Nistatina	Control Negativo
75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL	75mg/mL	150mg/mL	300mg/mL		
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,81	18,60±1,01	0,00

F1: extracto éter de petróleo

F2: extracto de acetato de etilo

F3: extracto hidroalcohólico



Fig. N° 34. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las flores de *Nicotiana paniculata* L en *Candida albicans*. F1: extracto en éter de petróleo, F2: extracto en acetato de etilo, F3: extracto hidroalcohólico al 60%. 1: 75mg/ml, 2: 150mg/ml, 3: 300mg/ml., 4:Nistatina, 5: control. Método de los pocillos.

La especie *Nicotiana paniculata* L òtabaco cimarrónö identificada por primera vez en 1753 (DöArcy, 1973), es una planta endémica de nuestro país según reportes en el Libro Rojo de las Plantas del Perú (León, 2006), que crece en las lomas de la costa peruana; aunque también, ha sido reportada su presencia en la sierra central y sur del Perú (Brako, 1991).

Esta planta ha sido colectada en la Reserva Nacional Lomas de Lachay, en la provincia de Chancay, departamento de Lima, donde la abundancia de esta especie en este ecosistema es reconocida por muchos autores (Giraldo, 2003; Cano, 1999; FAO, 1996; Ponce del Prado, 1995; Arana, 1988). Muchas especies y subespecies del mismo género tienen características parecidas por lo que ha sido necesario revisar y verificar el espécimen, identificarlo y clasificarlo con la ayuda de los especialistas del Museo de Historia Natural de la UNMSM, dejando una muestra para herbario registrada con el código USM: 217878 (ver anexos).

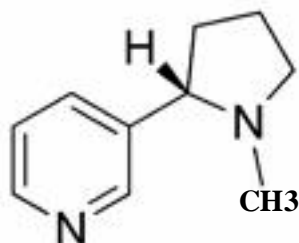
La descripción morfológica externa y la estructura histológica interna no presentan diferencias significativas con lo encontrado en el trabajo de Kuniyoshi en 1964, sin embargo no se han encontrando variedades dentro de los muestreos realizados en Lomas de Lachay y no se ha encontrado reportes de variedades de esta especie en nuestro país además de lo reportado por este autor.

Debemos citar como rasgos especiales en el estudio histológico, la presencia abundante de arenilla cristalífera en el tallo y hojas (Fig. 9-12), además de abundantes tricomas de tipo glandular grandes y pequeños, los de tipo tector cortos y largos de forma cónica en punta o de borde redondeado (Fig.9 y 11)

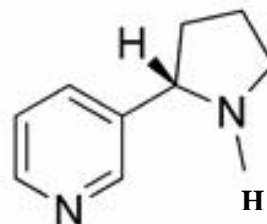
Según la marcha fitoquímica cuyos resultados se muestran en la tabla N°1, todos los extractos ensayados presentan taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, glucósidos y terpenoides, además de esteroides en menor cantidad.

Como los extractos hidroalcohólicos de hojas y flores (H3 y F3) presentan compuestos fenólicos y alcaloides se realizaron ensayos cromatográficos en capa

ro de metabolitos secundarios. Se encontró que F3
 nólicos y 2 alcaloides y el extracto H3 posee tres
 compuestos fenólicos y por lo menos dos alcaloides tal como se observa en la Fig.
 13. En todas las especies del género *Nicotiana* se han encontrado dos alcaloides en
 altas concentraciones las que serían nicotina ($C_6H_{14}N_2$) y nornicotina ($C_9H_{12}N_2$)
 cuyas fórmulas son: (Kuniyoshi, 1964)



Nicotina



Nornicotina

El bioensayo de *Artemia salina* representa un procedimiento sencillo y rápido para
 determinar la DL50 que significa la concentración del extracto hidroalcohólico de
Nicotiana paniculata L, cuyos principios se manifiestan tóxicos a las larvas de
 artemia. Al analizar los resultados en la tabla N° 3, se ha encontrado que la
 concentración letal media de de esta muestra es de 980 $\mu\text{g/mL}$, para el extracto
 hidroalcohólico de las flores, lo que equivale a decir que este extracto contiene
 sustancias de alta actividad biológica y con un potencial recurso que requiere de
 investigación. Esto se comprueba cuando el valor de CL^{50} de extracto
 hidroalcohólico expresado en $\mu\text{g/mL}$ es inferior a 1000 (García, 2003). Por otro
 lado el extracto alcohólico de hojas presenta una CL^{50} de 1100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 4), lo
 que indicaría que el extracto obtenido de flores es más citotóxico para la *Artemia*
salina.

La integridad genética en las células se encuentra comprometida por las sustancias
 que tienen contacto con ellas, por lo que es importante determinar el nivel aceptable
 de daño genético y realizar ensayos de genotoxicidad de manera rutinaria en
 poblaciones de riesgo (Zalacain, 2005, Burgaz, 1999, Georgiadis, 1999).

Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, que
 corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células
 hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan

por errores durante la replicación y posterior división
de los cromosomas expuestos a agentes genotóxicos (Díaz, 2004; Tzine, 2001).

El ensayo de micronúcleos en la médula ósea de ratón es una prueba *in vivo* considerado como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, para detectar agentes genotóxicos que son sustancias que causan tanto ruptura como pérdida de cromosomas completos al afectar por ejemplo: la función del huso mitótico; en ambos casos la migración y distribución de parte del material genético se ven alterados durante la anafase y telofase, lo cual conduce a la formación de núcleos secundarios o micronúcleos. Estos pueden identificarse fácilmente en eritrocitos jóvenes de la médula ósea. (Maluszynska, 2004; Nishikawa, 2002; Krishna, 2000; Abramson-Zetterberg, 1999; Assanami, 1999; Major, 1999).

Los ratones utilizados en el ensayo, fueron observados las primeras 30 horas después de suministradas las dosis respectivas y no mostraron cambios significativos en el consumo de agua, alimento, ni cambios en los perfiles de comportamiento respecto al grupo control.

El procedimiento para la obtención de las preparaciones de la médula ósea de los ratones fue realizado de acuerdo a la metodología de Schmid en 1975 nos permite obtener una tinción diferencial entre los eritrocitos policromáticos (EP) y los eritrocitos normocromáticos (EN), además de los eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMn), (Fig.14).

Resulta imprescindible para estos ensayos la utilización de un control negativo (vehículo o solvente de los compuestos evaluados), pues las respuestas genotóxicas y tóxicas de dichos compuestos se evidencian en la comparación con los valores de sus respectivos controles (Hamada, 2001). En nuestro trabajo, los valores medios de los índices de citotoxicidad (EP/EN) de nuestros grupos controles, estos oscilan entre 2,99 y 4,07; superando los valores reportados por la literatura que alcanzan solo hasta 1,70 para la especie *Mus musculus* (Remigio, 2001; Minissi, 1998) y hasta un 1,67 para las líneas cubanas (Cansino, 1993). Dado los componentes de este índice, la cantidad de eritrocitos maduros (EN) encontrados hasta contar los

es indican la existencia en la médula ósea de muchos eritropoyesis medular acelerada, o sea menos de 7 semanas de vida (Nishikawa, 2002), o cuando los animales están recuperando su equilibrio medular después de condiciones ambientales estresantes o de efectos tóxicos anteriores (Schmid, 1975). También, la tinción puede influir (Schmid, 1975). Cuando analizamos los valores medios de los índices de genotoxicidad (frecuencia de EPMn) de los valores negativos, de todas las evaluaciones realizadas, están en perfecta correspondencia con los valores de los controles negativos para la especie *Mus musculus*, reportados por la literatura consultada de hasta 4,49 (Salamone, 1994) y para las líneas cubanas que alcanzan valores de hasta 5,00 (Cansino, 1993). No obstante estos argumentos, no podemos afirmar cuál o cuáles pueden estar influyendo sobre nuestros animales, lo que si afirmamos es que tanto los animales control como los tratados tenían entre 6 y 10 semanas de vida y se mantuvieron en idénticas condiciones, antes y durante cada experimento realizado.

Al analizar los resultados de los índices de toxicidad en ratones machos y hembras tratados con extractos hidroalcohólicos de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* (Tabla 5 - 8) observamos que los extractos tienen efectos citotóxicos y que la toxicidad se incrementa con el aumento de la concentración de los extractos suministrados tal como observamos en las figuras 35 - 38, tomando como criterio de toxicidad la significación estadística de la disminución de la proporción EP/EN en una o más dosis sobre el control negativo (Chandra, 2002; Montero, 2001), lo que podría constituir un signo de alerta de la existencia de un componente tóxico con afinidad por el núcleo celular.

Para que las pruebas de ensayo de citotoxicidad *in vivo* sean consideradas válidas se recomienda una sola dosis y que la eutanasia de los animales debe realizarse entre las 24 a 48 horas después de suministrada las dosis (Datta, 2001; Gustavino, 2001; Sun, 1999). Además que siempre se deben trabajar con ambos sexos ya que se han reportado diferencias en la repuesta citotóxica entre machos y hembras (Krishna, 2000). Una posible explicación a estos resultados son las concentraciones de las hormonas femeninas en la sangre y su relación con la fisiología femenina

Para indicar que realizando una comparación entre los resultados de ambos sexos, notamos que los machos presentan índices de toxicidad más altos que las hembras, estando en concordancia con la literatura consultada donde se reporta que las hembras presentan menor índice de citotoxicidad en comparación de los machos cuando se les inyectaba o suministraba por vía oral sustancias químicas o extractos de diferentes plantas (Chandra, 2002; Krishna, 2000; Szyfter, 1999) (Fig. 39 y 40).

Al evaluar los extractos de hojas y flores encontramos que no se vieron diferencias estadísticamente significativas entre el índice de citotoxicidad entre los extractos, aunque debemos indicar que son ligeramente mayores en los extractos de las flores (Fig. 41 y 42).

Durante la división celular el material genético (ADN) contenido en el núcleo celular se replica y se divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas, al efecto de la radiación y a la acción de sustancias genotóxicas produciéndose pérdidas cromosómicas y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado núcleo secundario o micronúcleo (MN), visible fácilmente al microscopio óptico (Fig.14).

El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica (Zalacain, 2005; Santos-Mello, 2002; Saotome, 1999).

Los resultados de la frecuencia de MN en el ensayo de genotoxicidad *in vivo* producida por extractos hidroalcohólicos de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* (Tablas 9 - 12), nos muestra que el incremento de la frecuencia de micronúcleos va correlacionado con el incremento en la dosis de los extractos (Fig. 43 - 46).

Comparativo de los resultados de frecuencia de micronúcleos en machos y hembras ligeramente menor grado de presencia de micronúcleos recibiendo las mismas concentraciones de extractos (Fig. 47 y 48), lo que está en concordancia con la literatura consultada (Chandra, 2002; Krishna, 2000; Szyfter, 1999). Estos resultados se deberían a que el cromosoma Y en mamíferos según se ha reportado (Szyfter, 1999, Takagi, 1998) tiene la tendencia a perder segmentos de ADN, lo que estaría relacionado también con las concentraciones hormonales y la aparición de tumores.

Cuando analizamos la diferencia entre los extractos de hojas y flores, se observó que la frecuencias de micronúcleos producidas por los extractos no son significativamente diferentes, pero es ligeramente mayor en las hojas en los tratamientos I (25mg/Kg) y II (50mg/Kg), mientras que en el tratamiento III (75mg/Kg) es mayor en los extractos provenientes de las flores, lo que nos indicaría que habría mayor cantidad de la sustancia genotóxica en las flores que en las hojas (Fig. 49 y 50).

Los métodos más usados en la actualidad para evaluar actividad antimicrobiana de sustancias extraídas de plantas medicinales son: el método de Kirby óBauer o disco difusión y el método de pocillos o excavación que también sirven para hallar no sólo la potencia de los antibacterianos, sino también, la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos o sustancias usadas como posibles antibióticos (Toribio, 2004). Aunque en teoría cualquiera de los métodos anteriores podría utilizarse para hallar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales cada uno posee ciertos inconvenientes, razón por la cual en el momento de realizar las pruebas se deben hacer modificaciones para que estas metodologías sean adecuadas, reproducibles y fiables (Rojas, 2005).

Al utilizar ambos métodos para realizar nuestras evaluaciones de los extractos de *Nicotiana paniculata* hemos encontrado que el método de los pocillos es más sensible para detectar actividad antimicrobiana en plantas medicinales bajo condiciones estandarizadas en este estudio, tal como lo podemos apreciar en las Fig. 51 - 55.

e el solvente más efectivo para evaluar actividad 60%, ya que como se puede apreciar en los cuadros tanto en los extractos de hojas como flores, el extracto hidroalcohólico presenta con regularidad actividad antimicrobiana (Fig. 56 - 60), presentándose dos casos diferentes: *Staphylococcus aureus* que presenta actividad en los tres solventes de extractos de flores y *Pseudomonas aeruginosa* que presenta actividad en los tres solventes de los extractos de hojas. En todos los casos los solventes no muestran efecto inhibitorio (CN).

La utilización de sustancias naturales extraídas de plantas en el tratamiento de diferentes enfermedades incluyendo las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un remedio adecuado (Domingo, 2003), o cuando la medicina tradicional es una alternativa complementaria a la profesional para amplios sectores de la sociedad sobretodo para los sectores menos favorecidos y los indígenas que no llegan a tener acceso a la medicina clínica (Cabieses, 1996).

Se estima que las plantas producen más de 100 000 productos naturales de bajo peso molecular conocidos como metabolitos secundarios, esta diversidad tan rica resulta, en parte, de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa mejorada frente a los ataques de microorganismos, insectos u otros animales (Dixon, 2001).

Se han aislado aproximadamente 12 000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan solo el 10% de los metabolitos secundarios (Schultes, 1978). Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos. La razón de ser de estos compuestos se desconoce por el momento. Existen diferentes teorías: podrían ser diferentes compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano o realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin (Domingo, 2003).

los extractos de *Nicotiana paniculata* ensayados para antimicrobiana ha permitido encontrar una ligera actividad inhibidora del crecimiento bacteriano comparándolo con los controles tal como se observan en las tablas (12 a 32) y figuras (15 a 34) presentadas en los resultados. Analizando los resultados encontrados de la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* L podemos observar (Fig. 61), que tanto en hojas como flores el extracto hidroalcohólico presenta mayor actividad antimicrobiana siendo más sensibles las cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, Los extractos de hojas tienen mayor actividad en *Pseudomonas aeruginosa* aunque no se aprecia la misma actividad con el extracto de flores. Mientras que los extractos de hojas y flores tienen actividad constante para *Staphylococcus aureus* confirmando reportes anteriores donde los alcaloides presentan una actividad antimicrobiana en cocos Gram positivos y hongos (Domingo, 2003, Álvarez, 2005).

Staphylococcus aureus es un patógeno importante relacionado con un gran número de infecciones humanas y animales, como bacteriemias, infecciones de heridas, piel y tejidos blandos, etc., tanto en el hombre como animales, la acción antimicrobiana de los extractos de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* en esta especie podría estar relacionado con los alcaloides, azúcares y terpenos identificados en el screening fitoquímico y el mecanismo de acción podría deberse a una alteración en la membrana citoplasmática de la bacteria (Carson, 2002) y se relacionaría con el uso que le dan los campesinos de la zona de las zonas rurales que utilizan cataplasmas de hojas de tabaco cimarrón para evitar infecciones en sus animales de carga y/o cuando quieren eliminar las larvas de insectos lepidópteros. Debemos indicar que en esta especie se presentó una actividad microbiana de consideración en los tres extractos de flores para *Staphylococcus aureus* en las tres concentraciones usadas, aumentando el grado de inhibición al incrementarse la dosis (Tablas 33 y 34).

Con relación a *Pseudomonas aeruginosa*, debemos indicar que los resultados muestran una mayor actividad antimicrobiana de los extractos de hojas, además debemos resaltar que se ha obtenido una ligera actividad en una cepa de origen hospitalario de los extractos en alcohol al 60%, tanto en hojas como flores. Se

de múltiples mecanismos de resistencia intrínseca, que presencia en los aislamientos clínicos; estos mecanismos involucran cambios mutacionales, adquisición de plásmidos, lo que resulta en una elevada resistencia a los antibióticos (Moya, 2003). Nuestros resultados pueden ser considerados prometedores e interesantes ya que es una bacteria Gram ó no fermentadora muy resistente a los antibióticos y considerada como una bacteria intrahospitalaria muy peligrosa (Chumpitaz, 2001).

Para *Escherichia coli*, bacilo Gram negativo, la actividad antimicrobiana de los extractos es muy baja pudiendo considerarse a esta actividad bacteriostática en los extractos hidroalcohólicos, aunque no se descarta que puedan tener efecto sobre esta a dosis más altas a las empleadas en el presente trabajo; mientras que en el caso de *Candida albicans* que es una levadura oportunista que generalmente se encuentra la flora oral y gastrointestinal en individuos inmunocompetentes pero produce infecciones muy frecuentes en pacientes inmunocomprometidos (Davicino, 2007), la actividad de los extractos hidroalcohólicos de hojas y flores de *Nicotiana paniculata* en esta especie se consideraría fungistático coincidiendo con los reportes en otras plantas medicinales empleadas en la medicina tradicional (Alzamora, 2001), aunque debemos anotar que se aprecia un ligero efecto en la concentración más alta (300µg/mL), pudiendo encontrarse efecto a mayores concentraciones de las empleadas, sugiriéndose realizar estudios más profundos en esta área, ya que sería de utilidad con esta especie en la cual según reportes con otras plantas presenta una gran resistencia con los extractos usados (Alvarez, 2005; Toribio, 2004; Magallanes, 2003; García, 2003, Morales de Santa Gadea 2001; Rossi, 2000; Lozano 2000; Lazcano, s/f).

Estos resultados amplían los conocimientos sobre las propiedades biológicas de los extractos naturales, fruto de nuestra biodiversidad, contribuyendo a la estimación de riesgo-beneficio que puede derivarse del uso de estas plantas como fitoterapéuticos por el hombre.

1. Los extractos de *Nicotiana paniculata* presentan una ligera actividad antimicrobiana frente a cepas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* y una ligera inhibición para *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Los resultados muestran que el método de los pocillos o de excavación es mucho más sensible para la evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales en comparación con el método de Kirby ó Bauer o discos difusión.
2. La medición de la citotoxicidad y genotoxicidad a través de la prueba de micronúcleos en los extractos hidroalcohólicos de hojas y flores de *Nicotiana paniculata*, permite estimar que son capaces de producir daños nivel citogenético y al ADN *in vivo*, con una relación dosis-dependiente tanto para la frecuencia de micronúcleos como para el índice de células dañadas.
3. El ensayo para determinar la CL^{50} nos muestra que el extracto hidroalcohólico de flores de *Nicotiana paniculata* L tiene $980\mu\text{g/mL}$, mientras que la CL^{50} para el extracto hidroalcohólico de hojas es de $1100\mu\text{g/mL}$, lo que indicaría que el mayor potencial citotóxico de *Nicotiana paniculata* L se concentraría en sus flores.
4. El Screening Fitoquímico de *Nicotiana paniculata* L muestra que posee como principales constituyentes alcaloides, compuestos fenólicos y glicósidos lo que se confirmó mediante la cromatografía de capa fina.
5. El protocolo botánico realizado valida la identificación taxonómica de la especie recolectada en Lomas de Lachay como *Nicotiana paniculata* L, asimismo el estudio histológico de la especie reportó una estructura secundaria de raíz de dicotiledónea, estructura primaria de tallo y estructura bifacial de dicotiledónea.

AS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abramson-Zetterberg** L, Grawé J, Zetterberg G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. *Mutation research*. 1999; 423: 113-124.
2. **Alarco de Zadra** A. El Libro de las Plantas Mágicas. Compendio de la Farmacopea Popular. Segunda edición publicada por el CONCYTEC aumentada y revisada. 2000.
3. **Álvarez** M, Isaza G, Echeverri H. efecto antibacteriano *in vitro* de *Austroeupatorium inulaefolium* HBK (salvia amarga) y *Ludwigia poligonoides* (clavo de laguna). *Biosalud*. 2005; 14: 46-55.
4. **Alzamora** L, Morales L, Armas L y Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de la facultad de Medicina*. UNMSM. 2001; 62, (2):156-161.
5. **Angulo** HP. Proyecto de desarrollo de una base de datos de plantas medicinales y tóxicas en el Perú. Tesis de magíster en farmacología Experimental. UNMSM; 1988.
6. **Angulo** HP. La medicina Tradicional en el desarrollo de fitomedicamentos. El enfoque etnofarmacológico. Lima: de Mar; 1997. p. 129-154.
7. **Arana** CR y Julia IB. Estudio Farmacognóstico y de la actividad antimicrobiana de *Picramnia macrostachys* ðaniö (Simarubaceae). Trabajo de Aptitud Profesional de Licenciatura en Químico-Farmacéutica. 1987.
8. **Arana** C, Cano A, Roque J, Arakaki M y La Torre M. Respuesta de la Comunidad de Herbáceas de las Lomas de Lachay al Evento ðEl Niñoö 1997-98. Libro de resúmenes Seminario Taller Internacional ðEl Niño en América Latina, sus Impactos Biológicos y Sociales: Bases para un Monitoreo Regional. Lima-Perú. 1988
9. **Asanami** S, Shimono K. The effect of hyperthermia on micronucleus induction by mutagens in mice. *Mutation Research*. 1999; 446: 149-154.
10. **Atanassova** B, Daskalov S and Nikova V. Male Sterility in Three Solanaceae Genera (*Capsicum*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*) and its Application in Breeding and Hybrid Seed Production. Institute of Genetics ðProf. D. Kostovö, Bulgarian Academy of Sciences, Sofía, Bulgaria. Solanaceae V. Advances in Taxonomy and Utilization. New York Botanical Garden, New York, U.S.A. Editors R.G. Van den Berg, G.W.M: Barendse, G.M: Vander Weerden, C Mariani. Published by Nijmegen University Press: Netherlands. 2001; p. 349-361.

- der Werden GM and Mariani C. Management of
and the Botanical Garden of Nijmegen. Solanaceae V.
y and Utilization. New York Botanical Garden, New
York, U.S.A. Editors R.G. Van den Berg, G.W.M: Barendse, G:M: Vander
Weerden, C Mariani. Published by Nijmegen University Press. 2001.
12. **Bazalar** H, Arévalo F. Eficacia del utashayli contra la falsa garrapata (*Melophagus ovinus*).pp 87-95. 1989. En: Bazalar y Maccorkle. Estudios etnoveterinarios en comunidades altoandinas del Perú. 1989.
 13. **Bonati** A. Problems relating to the preparation and use extracts from medicinal plants. Fitoterapia. 1989; 60 (1): 5-11.
 14. **Bonilla** PE. Aislamiento e Identificación de Principios Activos de Plantas Medicinales. Segundo Curso Internacional de Plantas Medicinales y Fitoterapia FITO 2002. Libro de Resúmenes Publicado por el Instituto de Fitoterapia Americano. Lima. 2002.
 15. **Bozsakyová** E, Chalupa I, Sevová L, Slamenova D. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei induced by pentoxifylline in Vitro cultivated Chinese Hamster cells (V79) and human blood lymphocytes. Mutation Research. 2001; 459: 63-70.
 16. **Brack** A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos ðBartolomé de las Casasö. Cuzco. 1999.
 17. **Brack** A. Gran Geografía del Perú. Naturaleza y Hombre. Vol. III. La Fauna. 1ra. Edición. Editorial Juan Mejía Baca- Ediciones MANFER. 1986. 247pp.
 18. **Brako** L y Zarucchi JL. Catálogo de las Angiospermas del Perú. Monographs in Systematic Botany from The Missouri Botanical Garden. 1991; 45: 1112-1113.
 19. **Bruneton** J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Traducido por: Angel Villar del Fresno, Emilia Carretero Accme y Mercedes Rebuelta Lizabe. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Madrid. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza. 1991.
 20. **Burgaz** S, Karahalil B, Bayrak P, Taskin L, Yavuzaslan F, Bökesoy I, Anzion RBM, Bos RP, Platin N. Urinary cytosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplasctics. Mutation Research. 1999; 439: 97-104.
 21. **Bustinsa** F. Los Diferentes Grupos Vegetales en Relación con la Producción de Antibióticos. Anales del Jardín Botánico de Madrid. Sf; p. 95-104.

medicinales y su legislación. Seminario Taller "Control de Plantas Medicinales y Similares" Serie de documentos N°4. Instituto de Promoción de la Salud, Lima 12-14 agosto. 1996; p. 17-23.

23. **Cano A**, Roque J, Arakaki M, Arana C, de la Torre M, Llerena N y Refulio N. Diversidad Florística de las Lomas de Lachay (Lima) Durante el Evento "El Niño 1997 ó 1998". El Niño 1997-98 y su Impacto sobre Ecosistemas Marino y Terrestre. Juan Tarazona y Estela Castillo (Eds). Rev. Per. Biol. Vol. Extraordinario. 1999; 125-132.
24. **Cansino L**, Fonseca G, Remigio A, Salome I, Palacios M. Inducción de micronúcleos por ciclofosfamida en médula ósea de ratón en 5 líneas diferentes: Balb/c, DBA/2, OFI, NMRI y C57/BL/6. Programa del V Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas. Libro de Resúmenes. 1993.
25. **Capone W**, Mascia C, Spaneda L y Chiappini M. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from sadinian *Satureja thymbra*. Fitoterapia. 1989; 60 (1): 90-92.
26. **Carballo**, Marta A.; C.M. Cortada y A.B. Galano. Riesgos y Beneficios en el Consumo de Plantas Medicinales. Teoría, 2005; Vol. 14 (2): 95-108.
27. **Carson C**, Mee B, Riley T. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill. Lysis, leakage, and tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46:1914-1920.
28. **Cotillo Z**. Pedro A. y Luis A. Rojas R. Métodos Farmacológicos en la Investigación de Productos Vegetales. 1ra. Edición. CONCYTEC. Lima. 1990.
29. **Caycho A**. El Tabaco en la Farmacopea Vernacular y la Terapia Curanderil. Trabajo presentado al Congreso Médico "Carlos Enrique Paz Soldán" organizado por la Academia Nacional de Medicina. Lima, Diciembre de 1980.
30. **Caycho A**. Plantas cancerígenas y anticancerosas. Boletín de Lima, 1981; 10:64-68.
31. **Cerrate de Ferreira E**. Plantas Medicinales Andinas. "Plantas Medicinales en el Perú". Anales del Seminario "Plantas Medicinales" organizado por CONCYTEC y auspiciado por RELAB. Lima. 1990.
32. **Chandra G**, Koti T. The grapefruit flavone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. Mutation Research. 2002; 519: 37-48.

Effect of various concentrations of acyclovir on cell
nuclei induction on cultured HeLa cells. Mutation
55-165.

34. **Chang V.** Plan Maestro de la Reserva Nacional de Lachay. Ministerio de Agricultura. Dirección General de Flora y Fauna. Lima. 1979.
35. **Chifa C.** Plantas Usadas en la Medicina Tradicional en el Norte Argentino: Aspectos Fitoquímicos y Farmacológicos; su correlación con Especies Peruanas. Segundo Curso Internacional de Plantas Medicinales y Fitoterapia FITO 2002. Libro de Resúmenes Publicado por el Instituto de Fitoterapia Americano. Lima.
36. **Chumpitaz J, Medina J, Huamán A, Cigüeña S, Palomino S.** Resistencia bacteriana en infecciones intrahospitalarias de vías urinarias. Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales. 2001; 1(4): 1-6.
37. **Cronquist A** The Evolution and Classification of Flowering Plants. 2da. Edition. Bronx. New York. 1988.
38. **Cronquist A.** An Integrated System of Classification of Flowering Plants. The New York Botanical Garden. Columbia University Press. New York. 1981. p. 892-895.
39. **Córdova Y, Linares P, Vargas L.** Aplicación de la biocromatografía en la determinación de la actividad antimicrobiana de algunas plantas medicinales. Trabajo de Aptitud Profesional de Licenciatura en Química Farmacéutica. Lima: UNMSM. 1991.
40. **Córdova B, Rodríguez M, Salas M.** Determinación de la actividad antimicrobiana del propóleo frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. UNFV. s/f
41. **Data SS, Mallick PP, Rahman Khuda-Bukhsh A.** Comparative efficacy of two microdoses of a potentized homeopathic drug, Cadmiun sulphoricum, in reducing genotoxic effects producing by cadmium chloride in mice: a time course study. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2001; 1-9.
42. **DøArcy W.** Solanaceae Studies II. Typification of Subdivisions of *Solanum*. Ann. Missouri. Bot. Gard. 1973; 59:262-278.
43. **Davisinio R, Mattar M, Casali Y, Correa S, Petteneti E, Micalizzi B.** Actividad antifúngica de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Rev. Peru. Biol. 2007; 14 (2): 247-51.
44. **Departament of Agricultural: USA.** Nicotiana, Procedures for experimental use technical. Bolletin N°1586. Departament of Agriculture. 1980.

- nations. Perú. In: Days S.; Neywood V.; Herrera O.;
Hilton R. Centers of Plant Diversity 3. The Americas.
1997. p. 519 -527.
46. **Dillon M** and **Rundell P**. The Botanical response of the Atacama and Peruvian Desert Floras to the 1982-83 El Niño Event. In: Glynn P.W. Global Ecological Consequences of the 1982-83 El Niño Event ó Southern Oscillation. Elsevier Oceanography Series Amsterdam. 1989. p. 487 ó 504.
 47. **Dixon R**. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 2001; 411: 843-847.
 48. **Domingo D.** y **López-Brea M**. Plantas con acción antimicrobiana. Revisión. *Rev. Esp. Quimioterapia*. 2003 Diciembre; 16 (4): 385-393.
 49. **Domínguez X**. Métodos de investigación Fitoquímica. Editorial Limusa ó México. 1979.
 50. **Eisnberg D**, **Davis RB**, **Ettener SL**, **Wilkey S**, **Van Rompa Y**. Advising patients who seek alternative medical therapies. *Annals of Internal Medicine*. 1997; 127, 61-69.
 51. **Erdemoglu N** and **Sener B**. Antimicrobial Activity of the Heartwood of *Taxus baccata*. *Fitoterapia*. 2001; 72: 59-61.
 52. **Esau K**. Anatomía Vegetal. Primera edición en español. Ediciones Omega. Barcelona, 1972.
 53. **Evans Schultes R** and **Raffauf R**. De Plantis Toxicariis e Mundo Novo Tropice Commentationes XXXVI: Phytochemical and Ethnopharmacological Notes on the Northwest Amazon. Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution, ed. Hawkes, Lester, Nee & Estrada. Royal Botanic Gardens and Linnean Society of London. 1991. p. 25-49.
 54. **Fahn A**. Anatomía Vegetal. Tercera edición. Ediciones Pirámide, SA. Madrid. 1985.
 55. **FAO**. Perú: Informe Nacional para la Conferencia Técnica Internacional de la FAO para los Recursos Filogenéticos. Leipzig, 1996. 235pp.
 56. **Ferreira R**. Situación y Estrategias Nacionales en la Caracterización y Conservación de Plantas con Principios Activos Promisorios. . ó Promoción y Comercio de Plantas Promisorias con principios Activos Especiales de la Selva del Perú. Proyecto IICA-GTZ ó Orientación de la Investigación Agraria Hacia el Desarrollo Alternativo. Memorias del Seminario. Lima. 1999
 57. **Ferreira E** y **Canela de Alvarenga N**. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Aristolochia gibbata* ó patito. *Revista de Ciencias y Tecnología*. Dirección de Investigaciones ó UNA. 2000; 1 (2): 71- 77.

59. **Fuertes C**, Angulo P y Hernández L. La etnofarmacología y los bioensayos como nuevas estrategias en la investigación fotoquímica de la flora medicinal peruana. *Ciencia e Investigación*. 2001; 4 (2): 20-36.
60. **Gabriel S**. Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *Minthostachys tomentosa* (Benth) epling òwuanshamuñaõ sobre algunas bacterias y levaduras patogénicas. Tesis de Licenciatura en Biología. Lima: UNFV. 2002.
61. **Galán de Mera A**. Las Clases Fitosociológicas de la Vegetación del Perú. *Boletín de Lima*. 1999; 117: 84 ó 98.
62. **Galán de Mera A**. Datos sobre la vegetación del Centro del Perú. *Acta Botánica Malacitana*. 2004; 29:89-115.
63. **García M**. Estudio Farmacognóstico y actividad antimicrobiana de *Erodium cicutarium* L.H. òauja aujaõ. Tesis de Magister en Recursos Vegetales y terapéuticos. Lima: UNMSM. 2003.
64. **García J**, Cantón R, García J, Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. Procedimientos de Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los anitmicrobianos. Documento editato y publicado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid, España. 2000.
65. **Georgiadis P**, Kyrtopoulos SA. Molecular epidemiological approaches to the study of the genotoxic effects of urban air pollution. *Mutation Research*. 1999; 428: 91-98.
66. **Giraldo A** y Arellano G. Resiliencia de la comunidad epígea en las Lomas de Lachay después del evento El Niño 1997-1998. *Ecol. Apl*. 2003; 2 (1):59-68.
67. **Glass R**. Importancia, Posibilidades y Perspectivas del Aprovechamiento de las Plantas con Principios Activos a Nivel Mundial. òPromoción y Comercio de Plantas Promisorias con Principios Activos Especiales de la Selva del Perúõ. Proyecto IICA-GTZ òOrientación de la Investigación Agraria Hacia el Desarrollo Alternativoõ. Memorias del Seminario. Lima. 1999
68. **Gonzáles E**, Arias JL, Gutiérrez D, Arias J y Alarcón W. Actividad Antiinflamatoria de Plantas Medicinales vs Aines. Primer Congreso Internacional FITO- 2000. Primer Congreso Peruano de Plantas Medicinales y Fitoterapia. 2000. 27 ó 30 de setiembre. Lima.
69. **Goodman A**. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9na. Edic. Editorial Médica Panamericana: México. 1996. p. 69-82.

- us Nicotiana, origins, relationships and evolution of
of their Distribution, Morphology and Cytogenetics.
Chronica Botanica Company Waltham Mass.USA. 1954. p. 335-340.
- 71. Goodspeed H.** Plant Hunters in the Andes. 18 Bedford Square w.c. 1. Robert Hale Limited: Londres. 1961.
 - 72. Guabloche A.** Algunos aspectos de la biología de *Orizomys xantheolus* Thomas, 1894 (Rodentia, Sigmodontinae) en la reserva Nacional de Lachayö. Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología. UNFV. Lima. 2000.
 - 73. Gustavino B, Scornajenghi KA, Minissi S, Ciccotti E.** Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. Mutation Research. 2001; 494: 151-159.
 - 74. Hamada S, Yamasaki K, Nakanishi S, Omori T, Serikawa T, Hayashi M.** Evaluation of the general suitability of the rat for the micronucleus assay: the effect of cyclophosphamide en 14 strains. Mutation Research. 2001; 495: 127-134.
 - 75. Harbone JB.** Systematic Significance of Variations in Defense Chemistry in the Solanaceae. Solanaceae: Biology and Systematics. Edited by William G. DöArcy. Columbia University Press. New York. 1986.
 - 76. Harper G.** Plant Hunters in the Andes. Robert Hale Limited. 18 Bedford Square W.C.1. 1961 p. 429.
 - 77. Hawkes JG, Lester RN y Skelding AD.** The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Linnean Society Symposium Serie. Number 7. Publisher for The Linnean Society of London by Academia Press: London. 1979.
 - 78. Herrera FL.** Plantas que curan y plantas que matan en el departamento del Cuzco. Rev. Museo Nacional. Lima. 1940.
 - 79. Hütter E, Götze A, Nokolova T.** Chromosomal aberrations in humans as genetics endpoints to assess the impact of pollution. Mutation Research 1999; 445: 251-257.
 - 80. IICA y CEDEMETRA.** Plantas Medicinales y otras especies útiles. Un diagnóstico situacional sobre la producción, industrialización y comercialización. Managua. 2005.
 - 81. INEI-ANLIS.** Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales: test de difusión por discos y test de dilución. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Buenos Aires, Argentina. 2001.

ro de la Reserva Nacional de Lachay. Intendencia de
egidas. Instituto Nacional de Recursos naturales
el 2002.

83. **Ikram M** y Inamul H. Screening of medicinal plants for antimicrobial activity. Part I. Fitoterapia. 1980; 51 (6): 231-235.
84. **Ikram M.** y Inamul H. Screening of medicinal plants for antimicrobial activity. Part II. Fitoterapia. 1980; 51 (6): 281-284.
85. **Judd W,** Campbell C, Kellogg E, Stevens P. Plant Systematics. A Phylogenetic Approach. First Edition. Sinauer Associated. Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA. 1999.
86. **Krishna G,** Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. Mutation Research 455 (2000) 155-166.
87. **Krommer W,** Sebus J y Van Esch. Atlas de Histología Vegetal. Primera edición en español. Editorial Marbán. Madrid. 1985.
88. **Kunimoto C,** de la Cruz C y Arana M. Observaciones sobre la Ecología Poblacional del Ratón Doméstico en Lachay, Perú. Bull. Inst. fr. Études andines. 2002; 31 (2):323 -328.
89. **Kuniyoshi D.** Contribución al Estudio de los Alcaloides en la Especie *Nicotinana paniculata* Lö. Tesis de Bachiller. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 1964.
90. **Kvist LP.** Moraes M. Plantas psicoactivas. Botánica Económica de los Andes Centrales. 2006: 294:312.
91. **Lazcano H,** Dávila AR, Ávila SS y González SF. Estudio de las Propiedades antimicrobianas del tamarindo (*Tamarindus indica*). VII Congreso nacional de Ciencia de los alimentos y III Foro de Ciencia Y Tecnología de los Alimentos. Guanajuato. S/F. p. 189-197.
92. **León B.** et al. El Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Perú. Rev. Peru. Biol. Número especial. Diciembre del 2006; 13 (2):612-643.
93. **León J,** Tapia G, Avalos R. Purificación parcial y caracterización de una sustancia antimicrobiana producida por *Alteromonas sp* de origen marino. Rev. peru.bio. 2005; 12 (3):359-368.
94. **Lewis W.** Pharmaceutical Discoveries Based On Ethnomedicinal Plants: 1985 to 2000 and beyona. Economic Botany. 2003; 57 (1):126-134.
95. **Lock de Ugaz O.** Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994.

F. Screening fotoquímico y bioactividad de especies
Rev. de la Academia Peruana de Farmacia. 2000;

97. **López Guillén JE.** Algunas Consideraciones Morfológicas y Ecológicas de las Especies Peruanas de la Familia de las Solanáceas. Tesis para optar el grado de Doctor en Bioquímica y Farmacia. UNMSM. 1952.
98. **MacBride JF.** Flora of Perú. Botanical Series Field Museum of Natural History. 1962 May 11. Volume XIII, Part V-B, Number 1.
99. **Magallanes C, Córdova C y Orozco R.** Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de microalgas marinas de la costa central del Perú. Rev.peru.biol. 2003; 10 (2): 125-132
100. **Malaveille C, Hautefeuille A, Pignatelli B, Talaska G, Vineis P and Bartsch H.** Dietary phenolics as anti-mutagens and inhibitors of tobacco-related DNA adduction in the urothelium of smokers. 1996; 17 (10):2193-2200.
101. **Maluszynska J and Juchimiuk J.** Plant Genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. Arh Hig Rada Toksikol. 2005; 56: 177-184.
102. **Mace ES, Fox PN, White JW, De Lacey IH and Mac Laren CG.** The Icis Solution for the Integration of Diverse Data for the Efficient Management of Solanaceous Germplasm. Solanaceae V. Advances in Taxonomy and Utilization. New York Botanical Garden, New York, U.S.A. Editors R.G. Van den Berg, G.W.M: Barendse, G:M: Vander Weerden, C Mariani. Published by Nijmegen University Press. 2001. p. 369-379.
103. **Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F.** Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. Mutation Research. 2001; 489: 147-172.
104. **Major J. Jakab M, Tompa A.** The frequency of induced premature centromere division in human populations occupationally exposed to genotoxic chemicals. Mutation research. 1999; 445: 241-249.
105. **Martínez S.** Actualidad en biológicos derivados de plantas. Rev. Salud Anim. 2003; 25 (2): 73-82.
106. **Minissi S, Caccese D, Passafiume F, Grella A, Ciccotti E, Rizzoni M.** Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* roots tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. Mutation Research. 1998; 420: 74-84.

- a Gadea S, Díaz S, Gonzáles D, Huapaya B. Probiana del *Streptococcus pneumoniae* determinando oria mínima. Rev. Med. Exp. 2001; 18 (1-2) 35-37.
108. **Monge A.** Las plantas medicinales. Ejemplo de nuevo escenario de una clásica aproximación para el descubrimiento del medicamento. Revista de la Academia Peruana de Farmacia. 1996(Ene. 1996 ó Dic. 1998); 11-13: 6-20.
 109. **Mostacero J, Mejía F y Peláez F Peláez.** Fitogeografía del Norte del Perú. Publicado por CONCYTEC. Primera edición. Trujillo. 1996.
 110. **Moya A, Berrios D, Aleonares J, Ibáñez L, Hernández J, Joó L, Rodríguez A, Mustelier P, cadíz A, Esnard S.** Serotipificación y susceptibilidad antibacteriana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes quemados infectados. VacciMonitor. 2003; 12 (2)13-18.
 111. **Murria I, Wan A and Passreiter C.** Insecticidal Activity of Essential Oils to the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura*. Fitoterapia. 2001; 72: 65-68.
 112. **Mzileni O, Sitas F, Steyn K, Carrara H, Bekker Pieter.** Tobacco Control. 1999; 8: 398-401.
 113. **Nadir MT, Dari A, Alsarraj SM y Hussein WA.** The Effect of Different Methods of Extraction on the Antimicrobial Activity of medicinal Plants. Fitoterapia. 1986; 57 (5): 359-363.
 114. **Nagalakshmi MAH, Thangadurai D, Muralidara D & Pullaiah T.** Phytochemical and Antimicrobial Study of *Chukrasia tabularis* leaves. Fitoterapia. 2001; 72: 62-64.
 115. **Nee M.** Solanaceae Systematics for the 21st Century. Solanaceae V. Advances in Taxonomy and Utilization. New York Botanical Garden, New York, U.S.A. Editors R.G. Van den Berg, G.W:M: Barendse, G:M: Vander Weerden, C Mariani. Published by Nijmegen University Press. 2001.
 116. **Nishikawa T, Haresaku M, Fukushima A, Nakamura T, Adachi K, Masuda M, Hayashi.** Further evaluation of in vivo micronucleus test on rat and mouse Skin: results with five skin carcinogens. Mutation Research. 2002; 513: 93-102.
 117. **Oliveira NG, Castro M, Rodrigues AS, Goncalves IC, Cassapo R, Fernandes AP, Chaveca T, Toscano-Rico JM and Rueff J.** Evaluation of the genotoxic effects of the boron neutron capture reaction in human melanoma cells using the cytokinesis block micronucleus assay. Mutagenesis. 2001. 16 (5): 369-375.
 118. **OMS.** Monografías de la Organización Mundial de la Salud Sobre Plantas Medicinales. 2002. 357 pp.

- Genus *Nicotiana*: Evolution of Incompatibility in The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Symposium Series. Number 7. Editors J.G. Hawkes, Lester R.N., and A.D. Skelding. Published for Linnean Society of London by Academic Press. 1979.
120. **Paniagua R**, Nistal M, Sesma P, Alvarez-Uria M y Fraile B. Citología e Histología Vegetal y Animal. Primera edición en español. Editorial Interamericana. MacGraw-Hill. Madrid. 1994.
 121. **Palacios JW**. Plantas Medicinales Nativas del Perú ó II. Libro Editado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima. 1997.
 122. **Pahlov M**. El Gran Libro de las Plantas Medicinales. Ed. Everest. León. 1979. pp 124-126.
 123. **Pascual F** y Vicéns. Aspectos Históricos, Sociales y Económicos del Tabaco. En Monografía Tabaco. Adicciones. 2004. Vol 16. Suplemento 2.
 124. **Pefaur J**, López E, Dávila J. Ecología de la Biocenosis de Lomas en Arequipa. Boletín de Lima. 1981; 16-17-18: 120-128.
 125. **Pérez E** y Lock de Ugaz O. Directorio de Tesis Universitarias Peruanas (1986 ó 1995). Recurso Flora Volumen II. 1997.
 126. **Ponce del Prado C**. Las Lomas de Lachay; área piloto para la educación ambientadle la población de Lima. Boletín de Lima. 1995; 7 (42): 6-8.
 127. **Remigio A**, Pérez G, Fernández N, Bada A, Arteaga M, Mancebo A. Estudio genotóxico *in vivo* de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. Rev. Toxicol. 2001; 18:75-78.
 128. **Rivera MM**, Carballo C, Milanes M y *et al*. Efecto de plaguicidas de origen botánico sobre el áfido *Carolinaia cyperi* Ainslie. *Rev Cubana Plant Med*, sep.-dic. 2003, vol.8, no.3, p.0-0. ISSN 1028-4796.
 129. **Robbiano L**, Mereto E, Migliazzi Morando A, Pastore P, Brambilla G. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutation Research*. 1998; 413: 1-6.
 130. **Roddick J**. The Importance of the Solanaceae in Medicine and Drug Therapy. Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution, ed. Hawkes, Lester, Nee & Estrada. Royal Botanic Gardens and Linnean Society of London. 1991. p. 7-23.
 131. **Rodríguez J**. Estudio de la estabilidad de productos fitoterapéuticos, experiencia cubana en este campo. Segundo curso Internacional de Plantas medicinales y Fitoterapia. Fito 2002. 29 julio-03 de agosto.

Radio de la Biodiversidad Cuenca del Cotahuasi: La
Flora Medicinal. Publicación de la Asociación
desarrollo ó AEDES. Arequipa. 1998.

133. **Rojas J, García A, López A.** Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. BLACPMAR Marzo de 2005; 4 (2):28-32
134. **Rossi C, Arias G, y Lozano N.** Determinación antimicrobiana de lagunas especies de la Familia Asterácea. Revista Peruana de Farmacia. 2000; 15: 62-68.
135. **Ruiz U.** Estudio de la actividad antimicrobiana y antiviral de *Hypericum laricifolium* òchichango del Perú. Tesis de licenciatura Químico Farmacéutico. Lima: UNMSM. 2003.
136. **Schultes r.** The kingdom of plants. En Thomsom, WAE (Ed.). Medicine from the Earth. Macgraw-Hill Book Co. New York. 1978.
137. **Sacsquispe R y Velásquez J.** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas técnicas. N°30 Instituto Nacional del Salud: Lima, 2002. 68pp.
138. **Sagástegui A.** Manual de las Malezas de la Costa Peruana. Impreso en los Talleres Gráficos de la Universidad Nacional de Trujillo. 1973.
139. **Sagástegui Ao y Leiva S.** Flora invasora de los cultivos del Perú. Trujillo: Perú. 1993. p. 253, 265-266.
140. **Salas M y Castro de la Mata R.** Producto Natural: su uso en la medicina casera y como medicamento. (Resumen). Seminario Taller òControl de calidad de medicamentos herbales y similares. Serie de documentos N°4 .Instituto Nacional de Salud, Lima 12-14 agosto. 1996. p. 37-39.
141. **Salame A, Castro A, Salgado I, Mendieta E, Herrera J, Ramírez J.** Evaluación estacional d la producción de esteroides sexuales en testículos de ratón de diferentes clases de edad. Acta Zoológica Mexicana (n.s.). 2004; 20 (3): 103.114.
142. **Salamone M, Mavournin K.** Bone marrow micronucleus assay. A review of the Mouse stocks used. Environ. Mol. Mutagen. 1994; 24 (4): 239-273.
143. **Sanz ó Elorza M, Dana E y Sobrino E.** Aproximación al listado de plantas vasculares alóctonas invasoras reales y potenciales en las islas Canarias. Lazaroa 2005; 26:55-66.
144. **Santos-Mello R, Deimling LI, Lauer Júnior CM, Almeida A.** Induction of micronuclei by alkaloids for 23 years. Mutation Research. 2002; 516: 23-28.

- Schmidt T, Neuhauss E, Almeida A. Induction of *in vivo* and *in vitro*. Mutation Research. 1999; 446:
146. **Saotome** K, Sofuni T, Hayashi M. A micronucleus assay in sea urchin embryos. Mutation Research. 1999; 446: 121-127
 147. **Sequeira** L. Bacterial Hypersensitivity. Nicotiana: Procedures for Experimental Use. Technical Bulletin 1586. U.S. Department of Agriculture.1979.
 148. **Shelby** MD, Tice RR, Witt KL. 17- β -Estradiol fails to induce micronuclei en the bone marrow cells of rodents. Mutation Research. 1997; 395: 89-90.
 149. **Siwinska** E, Mielzynska D, Bubak A, Smolik E. The effect of coal and environmental tobacco smoke on the level of urinary 1-hydroxypyrene. Mutation Research. 1999; 445: 147-153.
 150. **Smith**, T.E. and E. E. Clayton. Inheritance of Resistance to Bacterial wilt in Tobacco. Journal of Agricultural Research, Washington, D.C. Vol 76, Nº 1. Jan.1.
 151. **Schmid** W. The micronucleus test. Mutation Research. 1975; 31: 9-15.
 152. **Strasburger** E. Tratado de Botánica. 8va. Edición castellana. . Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1997.
 153. **Soukup** J. Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana y Catálogo de los Géneros. Ed. Salesiana. 1978. p. 288.
 154. **Sumar** L y Jiménez S. Estudio de Algunas Especies de Nicotiana (Solanaceae) Nativas del Perú, con Fines Insecticidas. Rev. Per. Ent. Diciembre1979; 22 (1).
 155. **Surh** Y, Gon Kim S, Liem A, Wook Lee J, Miller J. Inhibitory effects of isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4- methylthiazol-2-yl) carbamoyl] acetate (YH439) on benzo[a]pyrene-induced skin carcinogenesis and micronucleated reticulocyte formation in mice. Mutation Research. 1999; 423: 149-153.
 156. **Szyfter** K, Szmaja Z, Szyfter W, Hemminki K, Banaszewski J, Jaskula-Sztul R, Louhelainen J. Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer. Mutation Research. 1999; 445:259-274.
 157. **Tagaki** T, Sasai K, Shibamoto Y, Akagi K, Oya N, Shibata T, Kim J, Hiraoka M. The influence of DNA ploidy of a human tumor cell line on the frecuences of micronuclei or chromosome aberrations after irradiation. Mutation Research. 1998; 418: 49-57.

iversity and Classification Flowering Plants. First
ersity Press. 1997.

159. **Toribio MS**, Oriani DS y Skliar MI. Actividad antimicrobiana de *Centaurea solstitialis* y *Centaurea calcitrapa*. *Ars. Pharm.* 2004; 45(4): 335-341.
160. **Tszine N**, Jackson-Cook C. The application of spectral karyotyping (SKY) and fluorescent in situ hybridization (FISH) technology to determine the chromosomal content(s) of micronuclei. *Mutation Research.* 2001; 495: 11-19.
161. **Ulacio D**, Pérez y Pineda J. Microflora asociada a las raíces de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) provenientes del Estado Portuguesa. *Bioagro.* 1997; 9 (1): 3-11.
162. **Vallarino-Kelly T**, Morales-Ramírez P. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxic activity of colchicine in murine erythroblast in vivo. *Mutation Research.* 2001; 495: 51-59.
163. **Vilcapoma S.**, Graciela. Solanáceas Ornamentales de Lima. *Boletín de Lima.* 1989; (65): p. 67-84.
164. **Vilcapoma G.** Las Solanáceas del Valle de Chillón, Lima. *Boletín de Lima.* 1987; (52): p 63 ó 82.
165. **Weberbauer A.** El Mundo Vegetal de los Andes Peruanos: Estudio Fitogeográfico. Edición revisada y Ampliada de: Die Pflanzenwelt der peruanischen Anden. Leipzig. Wilhelm Engelmann, 1911. Ministerio de Agricultura. Lima. 1945.
166. **Witschi H**, Espiritu I, Dance S, Miller M. a Mouse lung tumor model of tobacco smoke carcinogenesis. *Toxicological Sciences.* 2002; 68: 322-330.
167. **Wust, W.** Aves de Las Lomas de Lachay. *Boletín de Lima.* 1987; (54): 19 ó 22.
168. **Zalacain M**, Sierrasesúmagá L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos.
169. **Zelada DA**; Carriles JM. La importancia de las plantas psicotrópicas para la economía de intercambio y relaciones de interacción en el Altiplano Sur Andino. *Complutum.* 2000; (11):275-284.
170. **Zotti-Martelli L**, Peccatori M, Scarpato R, Migliori L. Induction of micronuclei in human lymphocytes exposed in vitro to microwave radiation. *Mutation Research.* 2000; 472: 51-58.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ANEXOS

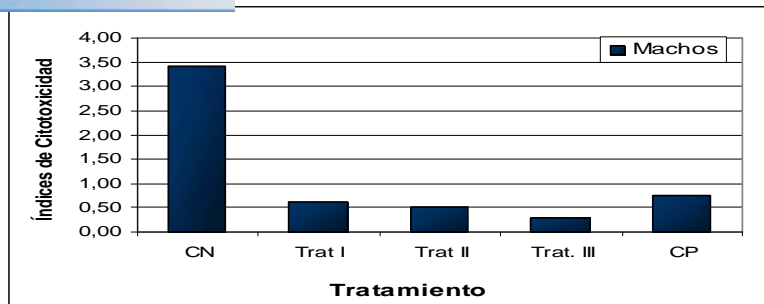


Fig. Nº 43. Resultados de Índices de Citotoxicidad en ratones Machos con Extractos Hidroalcohólico de Hojas de *Nicotiana paniculata*

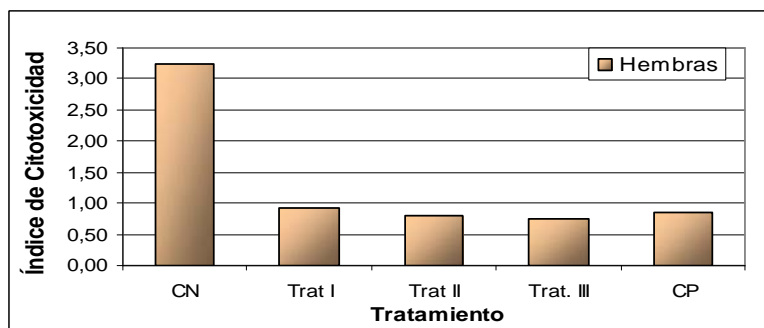


Fig. Nº 44. Resultados de Índices de Citotoxicidad en ratones Hembras con Extractos Hidroalcohólico de Hojas de *Nicotiana paniculata*

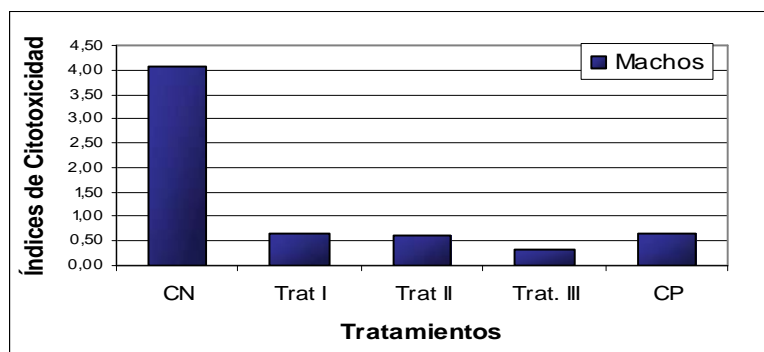


Fig. Nº 45. Resultados de Índices de Citotoxicidad en ratones Machos con Extractos Hidroalcohólico de Flores de *Nicotiana paniculata*

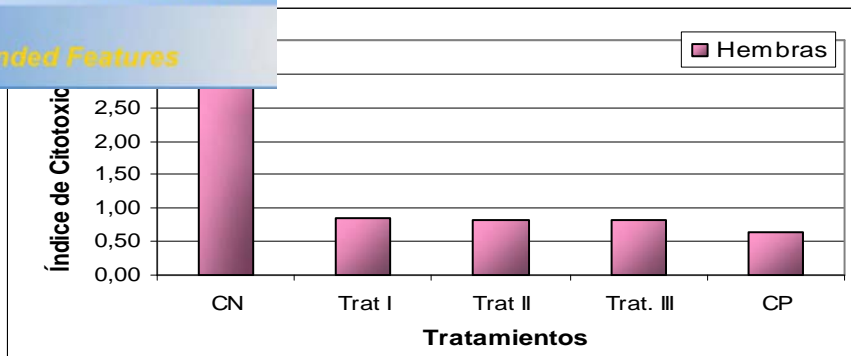


Fig. Nº 46. Resultados de Índices de Citotoxicidad en ratones Hembras con Extractos Hidroalcohólico de Flores de *Nicotiana paniculata*

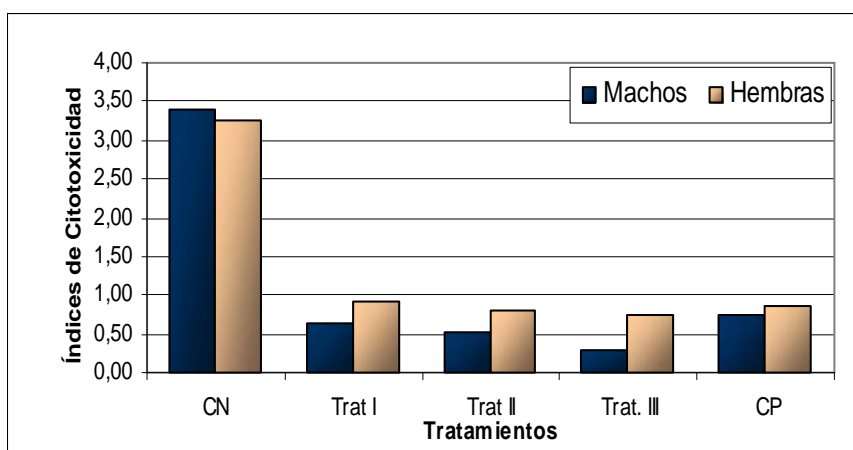


Fig. Nº 47. Comparación por Sexos de los Resultados de los Índices de Citotoxicidad en Ratones con Extractos Hidroalcohólico de Hojas de *Nicotiana paniculata*

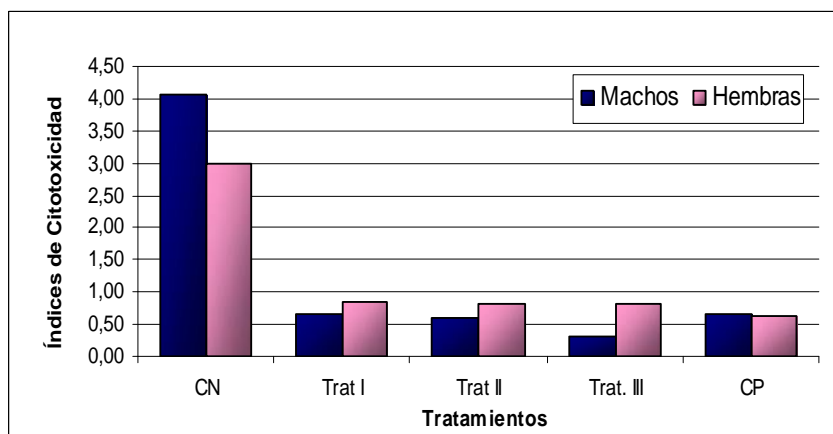


Fig. Nº 48. Comparación por Sexos de los Resultados de los Índices de Citotoxicidad en Ratones con Extractos Hidroalcohólico de Flores de *Nicotiana paniculata*

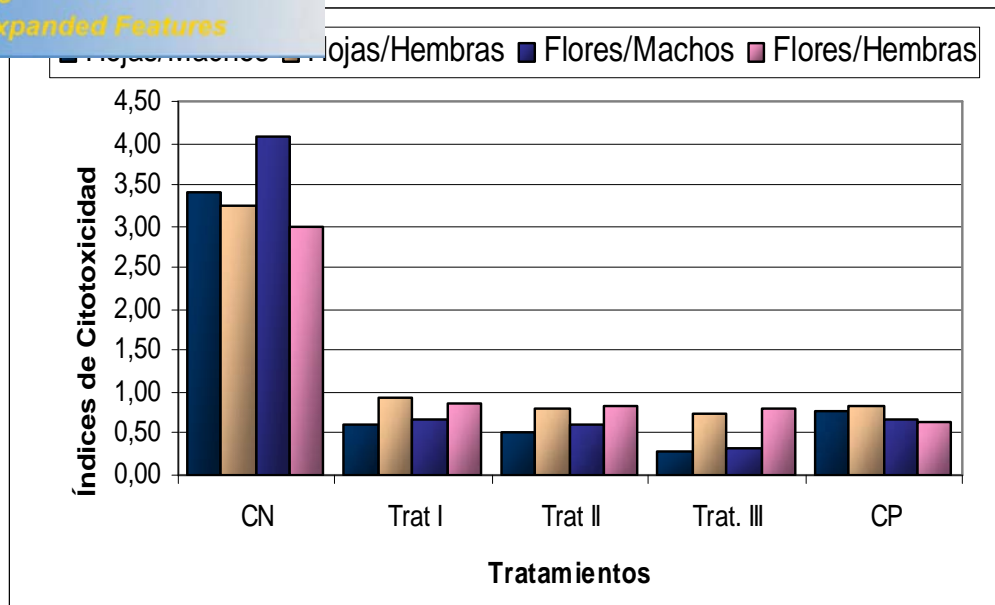


Fig. Nº 49. Comparación de los Resultados de los Índices de Citotoxicidad en Ratones con Extractos Hidroalcohólicos de Hojas y Flores de *Nicotiana paniculata*

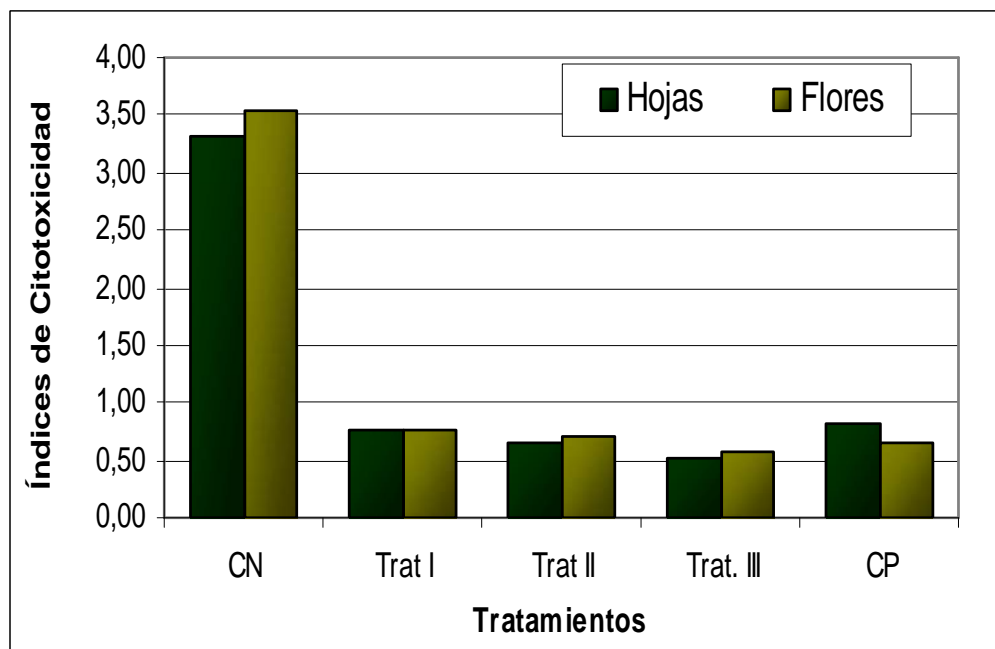


Fig. Nº 50. Comparación de los Índices de Citotoxicidad Promedio en Ratones con Extractos de Hojas y Flores de *Nicotiana paniculata*

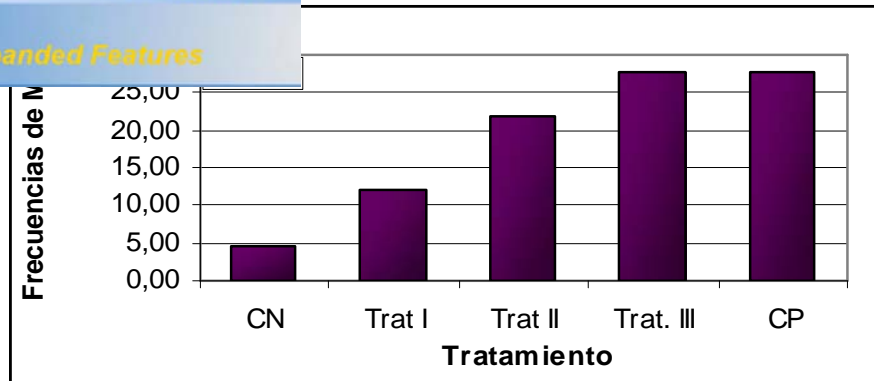


Fig. Nº 51. Resultados de Frecuencias de MN en Ratones Machos con Extractos Hidroalcohólicos de Hojas de *Nicotiana paniculata*

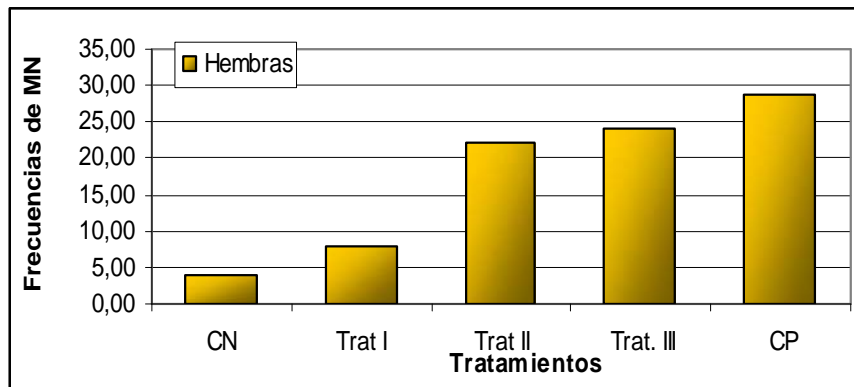


Fig. Nº 52. Resultados de Frecuencias de MN en Ratones Hembras con Extractos Hidroalcohólico de Hojas de *Nicotiana paniculata*

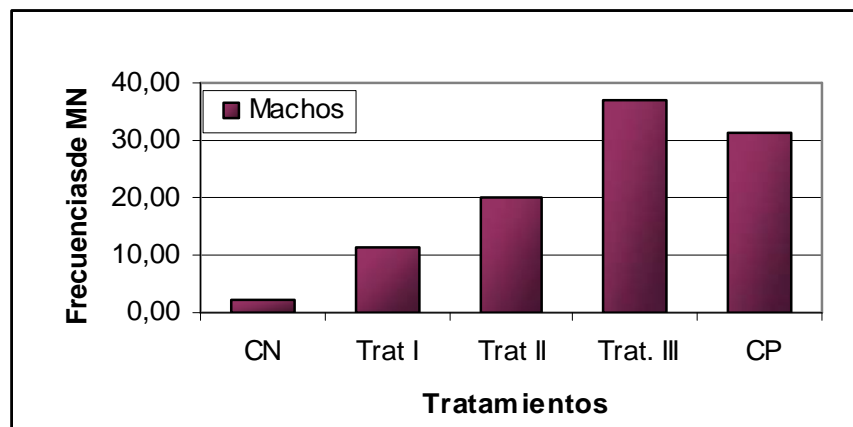


Fig. Nº 53. Resultado de Frecuencias de MN en Ratones Machos con Extractos hidroalcohólicos de Flores de *Nicotiana paniculata*

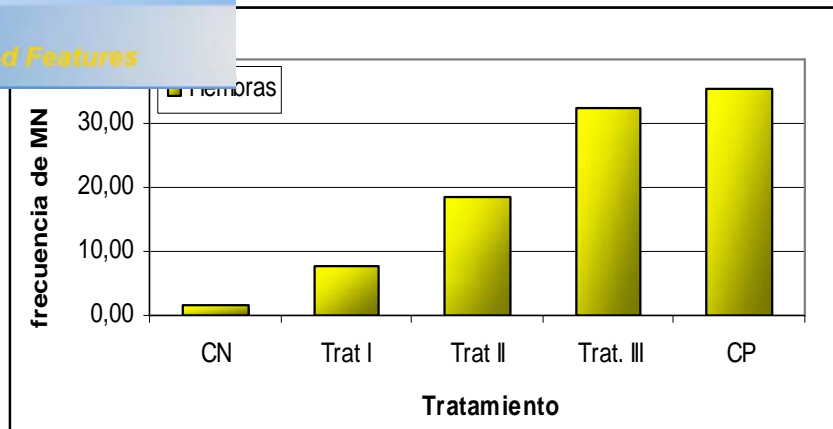


Fig. Nº 54. Resultados de Frecuencias de MN en Ratones Hembras con Extractos Hidroalcohólico de Flores de *Nicotiana paniculata*

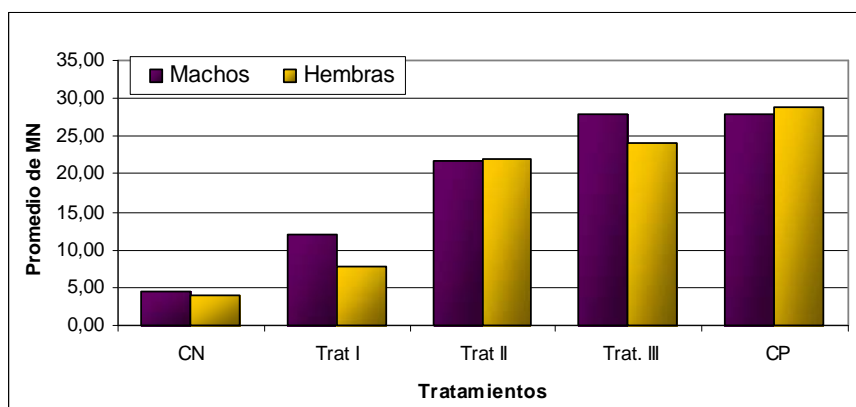


Fig. Nº 55. Comparación de los Resultados por Sexos de Frecuencias de MN en Ratones con extracto hidroalcohólico de Hojas de *Nicotiana paniculata*.

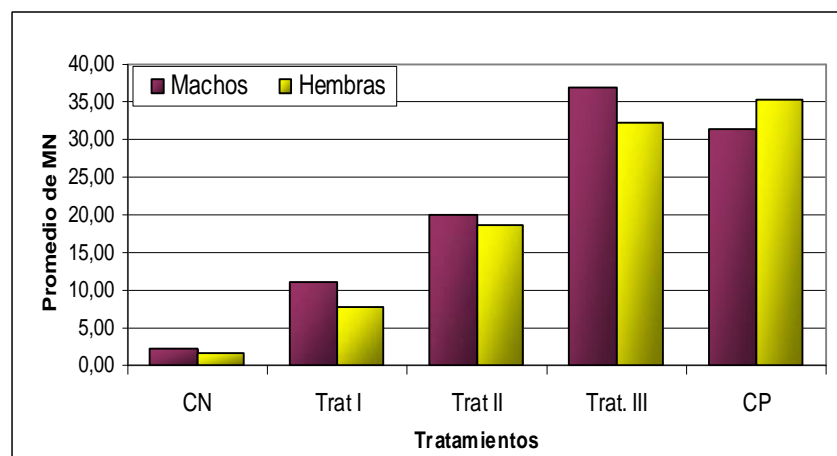


Fig. Nº 56. Comparación de los Resultados por Sexos de Frecuencias de MN en Ratones con Extracto Hidroalcohólico de Flores de *Nicotiana paniculata*.

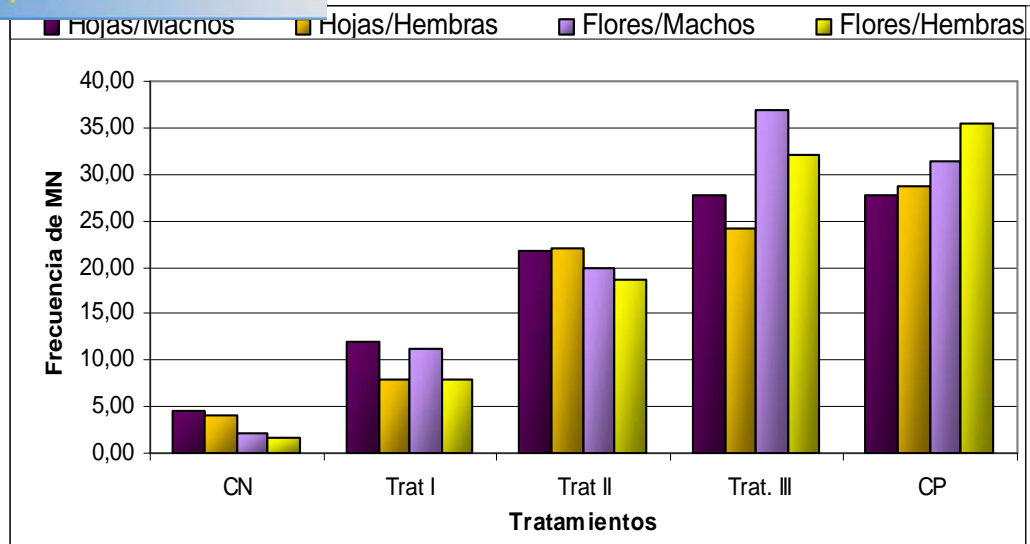


Fig. Nº 57. Comparación de los Resultados de Frecuencias de MN en Ratones con Extractos Hidroalcohólicos de Hojas y Flores de *Nicotiana paniculata*.

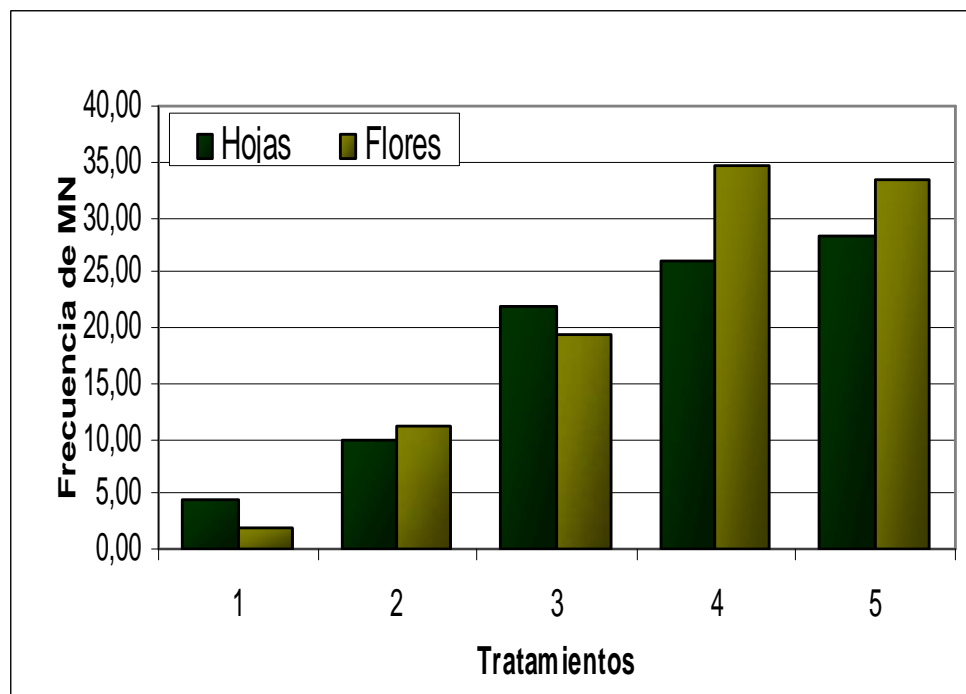


Fig. Nº 58. Comparación de la Frecuencia Promedio de MN en Ratones con Extractos Hidroalcohólicos de Hojas y Flores de *Nicotiana paniculata*.

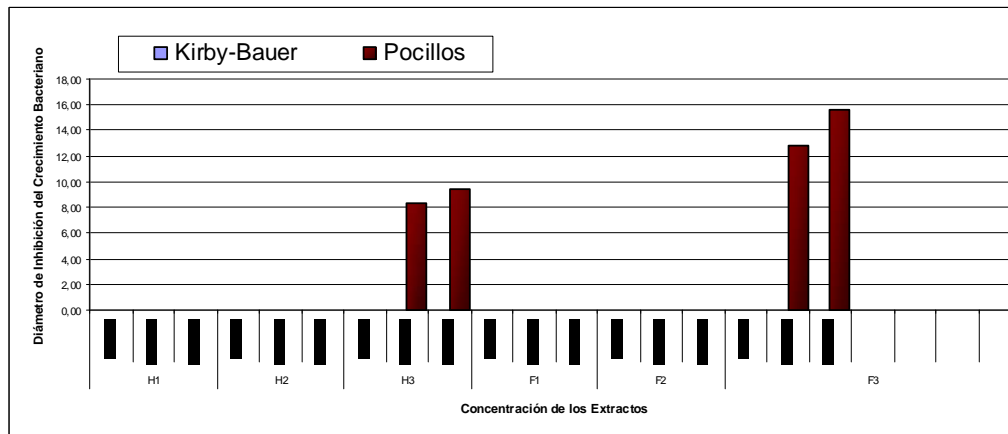


Fig. Nº 59. Comparación entre el Método de Kirby-Bauer y el Método de los Pocillos para *Escherichia coli*

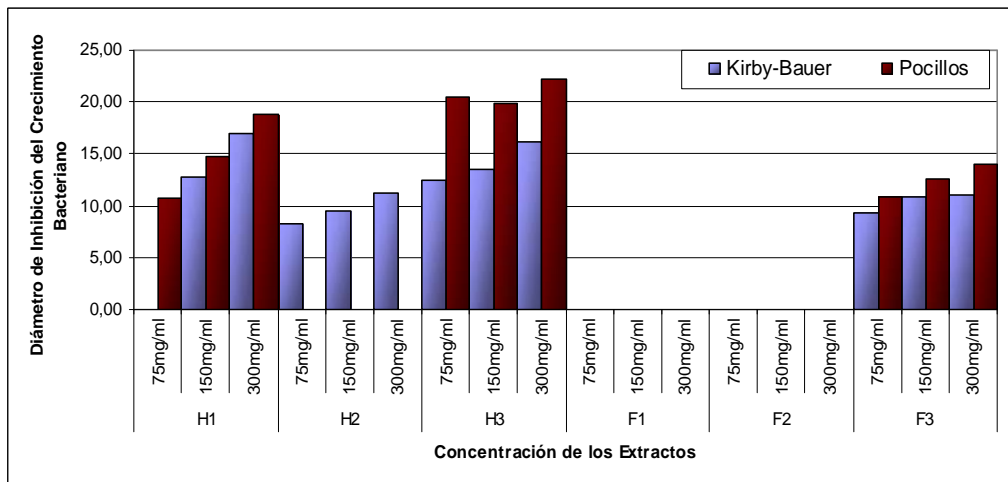


Fig. Nº 60. Comparación entre el Método de Kirby-Bauer y el Método de los Pocillos para *Staphylococcus aureus*.

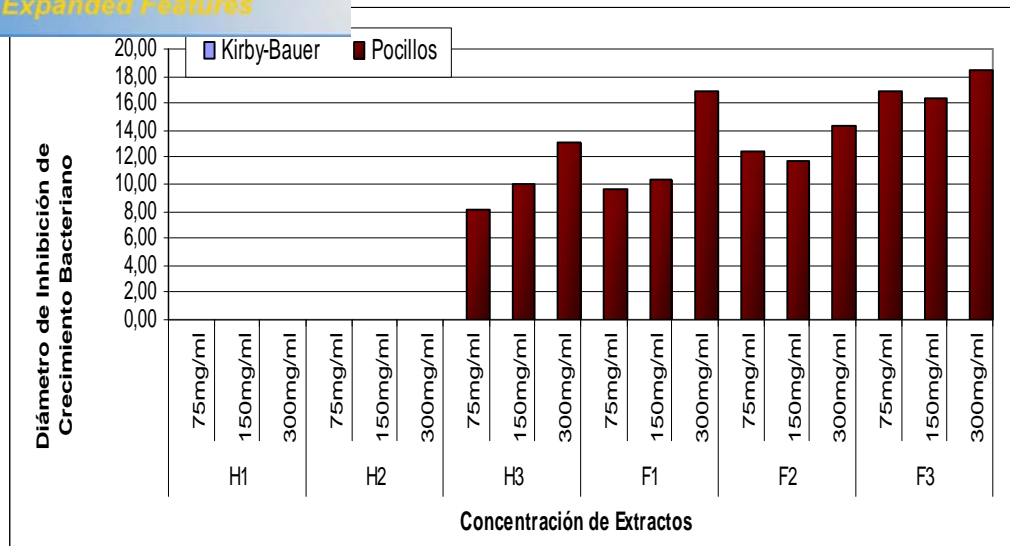


Fig. Nº 61. Comparación entre el Método de Kirby-Bauer y el Método de Pociillos para *Pseudomonas aeruginosa*.

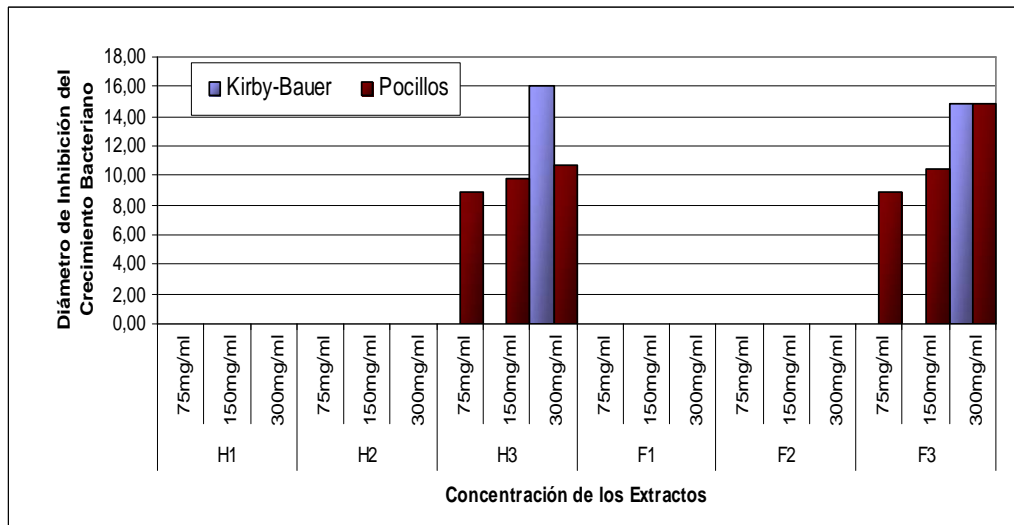


Fig. Nº 62. Comparación entre el Método de Kirby-Bauer y el Método de los Pociillos para *Pseudomonas aeruginosa* HM.

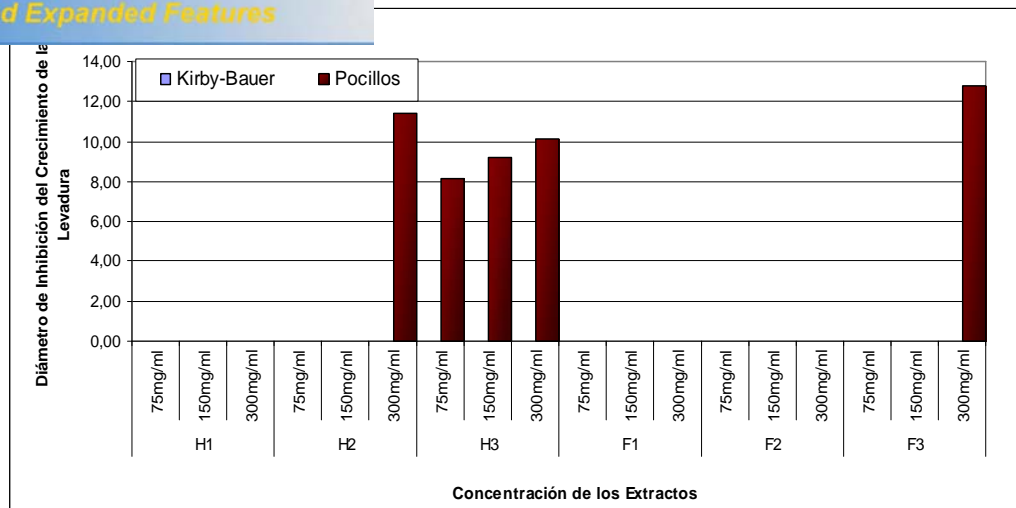


Fig. N° 63. Comparación entre el Método de Kirby-Bauer y el Método de Los Pociillos para *Candida albicans*

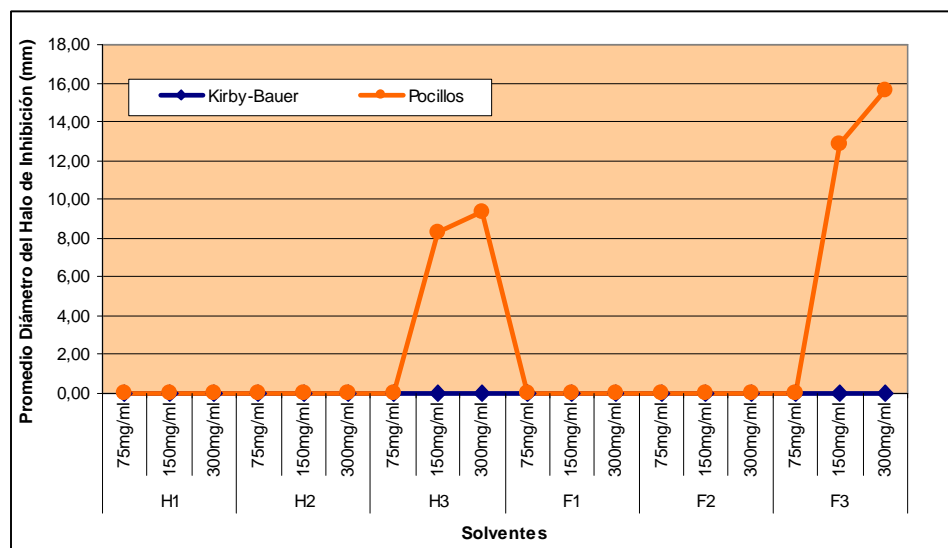


Fig. N° 64. Comparación de los Solventes Usados para Evaluar Actividad Antimicrobiana para *Escherichia coli*. H1: extracto éter de petróleo, F1: extracto éter de petróleo, H2: extracto de acetato de etilo, F2: extracto de acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico, F3: extracto hidroalcohólico

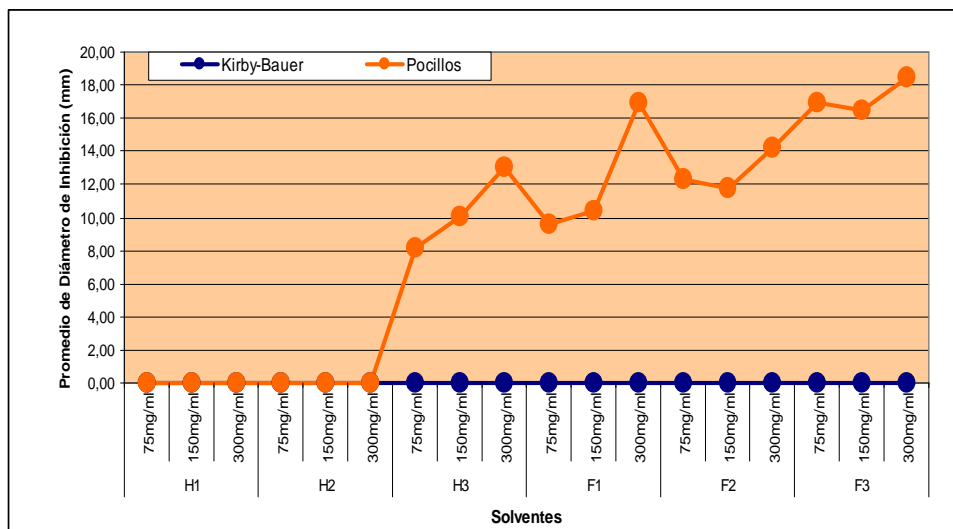


Fig. Nº 65. Comparación de los Solventes Usados para Evaluar Actividad Antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*. H1: extracto éter de petróleo, F1: extracto éter de petróleo, H2: extracto de acetato de etilo, F2: extracto de acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico, F3: extracto hidroalcohólico

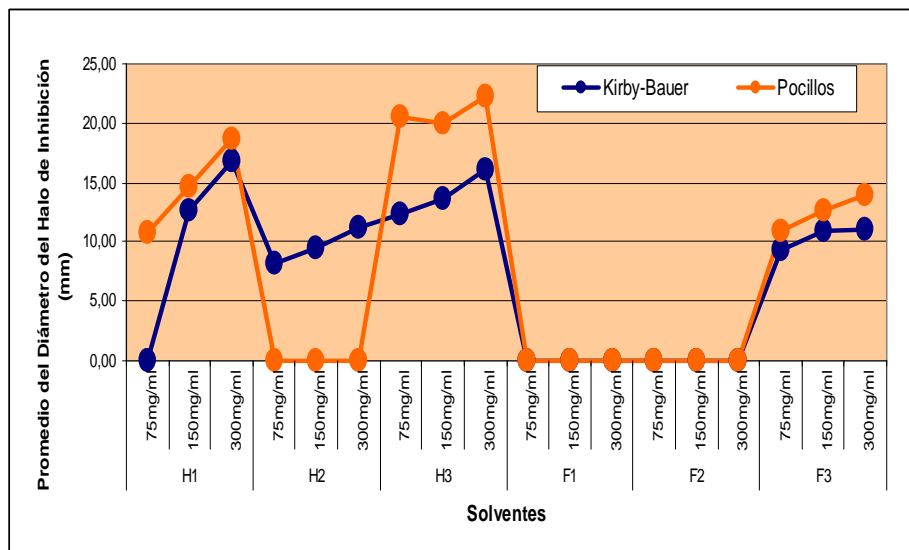


Fig. Nº 66. Comparación de los Solventes Usados para Evaluar Actividad Antimicrobiana para *Pseudomonas aeruginosa*. H1: extracto éter de Petróleo, F1: extracto éter de petróleo, H2: extracto de acetato de etilo, F2: extracto de acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico, F3: extracto hidroalcohólico

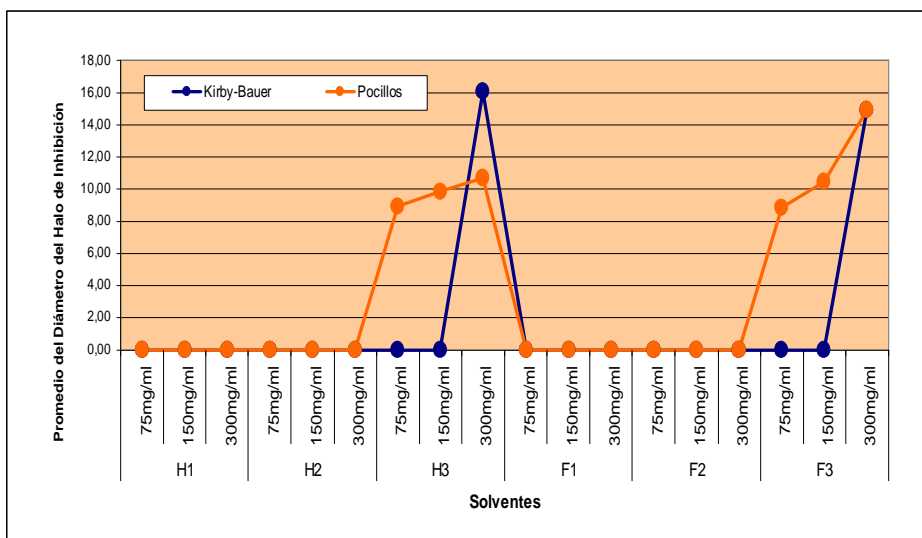


Fig. N° 67. Comparación de los Solventes Usados para Evaluar Actividad Antimicrobiana para *Pseudomonas aeruginosa* HM. H1: extracto éter de petróleo, F1: extracto éter de petróleo, H2: extracto de acetato de etilo, F2: extracto de acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico, F3: extracto hidroalcohólico.

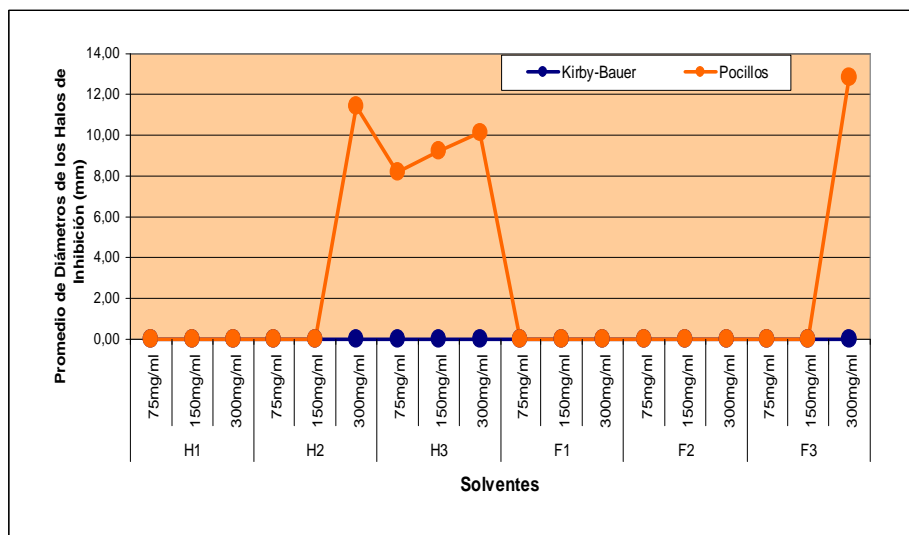


Fig. N° 68. Comparación de los Solventes Usados para Evaluar Actividad Antimicrobiana para *Candida albicans*. H1: extracto éter de petróleo, F1: extracto éter de petróleo, H2: extracto de acetato de etilo, F2: extracto de acetato de etilo, H3: extracto hidroalcohólico, F3: extracto hidroalcohólico.

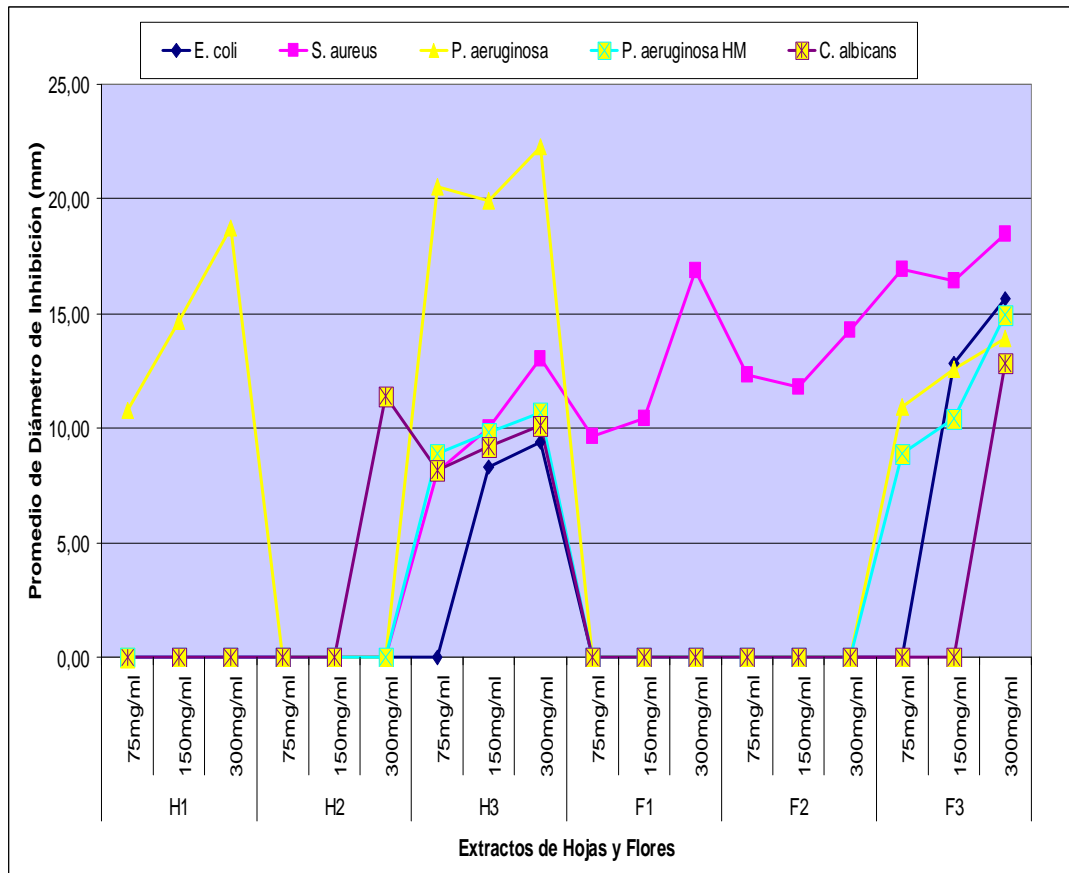


Fig. Nº 69. Comparación entre la Acción Antimicrobiana de Hojas y Flores de *Nicotiana paniculata* L en Bacterias y Levaduras

de la Actividad Antimicrobiana de tres extractos
Nicotiana paniculata L

	H1			H2			H3		
Microorganismos	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	++
<i>P. aeruginosa</i>	+	++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i> HM	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	++	+	+	+

(-) no detectable
(+) 7 a 10 mm
(++) 11 a 15 mm
(+++) 16 a 30 mm

H1: extracto en éter de petróleo
H2: extracto en acetato de etilo
H3: extracto hidroalcohólico

1: 75mg/mL
2: 150mg/mL
3: 300 mg/mL

Tabla N° 34. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de tres extractos flores de *Nicotiana paniculata L*

	F1			F2			F3		
Microorganismos	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	++	++
<i>S. aureus</i>	+	+	+++	++	++	++	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	+	++	++
<i>P. aeruginosa</i> HM	-	-	-	-	-	-	+	++	++
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	++

(-) no detectable
(+) 7 a 10 mm
(++) 11 a 15 mm
(+++) 16 a 30 mm

F1: extracto en éter de petróleo
F2: extracto en acetato de etilo
F3: extracto hidroalcohólico

1: 75mg/mL
2: 150mg/mL
3: 300 mg/mL